

**Beobachtung der Zusammensetzung von  
Mikrobenpopulationen und ihren natürlichen und induzierten  
Veränderungen durch Trennung und Darstellung ribosomaler  
Nukleinsäuresequenzen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
Dissertation

von **Gabriele Wieland**  
aus **Hannover**

1. Referent:	Prof. Dr. Backhaus
2. Referent:	Prof. Dr. Stackebrandt
eingereicht am:	06.03.2000
mündliche Prüfung (Disputation) am:	30.06.2000

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	8
2.1.	Versuchsansätze	8
2.2.	Probenahme	11
2.3.	Nukleinsäureextraktionen	12
2.3.1.	Extraktion von Ribosomen zur Gewinnung von rRNA	12
2.3.2.	Extraktion von DNA aus Umweltproben	14
2.3.3.	Extraktion von DNA aus Reinkulturen	15
2.4.	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	16
2.5.	Polymerase-Kettenreaktion	16
2.5.1.	Primer	16
2.5.2.	Amplifikation von Nukleinsäuren	18
2.5.2.1.	PCR zur Amplifikation von Abschnitten der 16S rDNA	19
2.5.2.2.	RT-PCR zur Amplifikation von Abschnitten der 16S rRNA	21
2.6.	Temperatur Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE)	23
2.6.1.	Gelpräparation und Elektrophorese	24
2.6.2.	Färbung von TGGE-Gelen	25
2.6.3.	Elution von Banden aus TGGE-Gelen	26
2.6.4.	Klonierung und Sequenzierung eluierter TGGE-Banden	27
2.7.	Clusteranalyse der TGGE-Profile	29
2.8.	V6-Sonden	31
2.8.1.	Sondenherstellung	31
2.8.2.	Blotten	32
2.8.3.	Hybridisierung und Nachweis von DIG-markierten V6-Sonden	33

<b>3.</b>	<b>Experimente und Ergebnisse</b>	34
<b>3.1.</b>	<b>Extraktion von Nukleinsäuren aus Umweltproben</b>	34
<b>3.2.</b>	<b>Entwicklung von PCR-Primern</b>	38
3.2.1.	Universelle Primer zur Amplifikation der Region V1-V3 der 16S rDNA	38
2.2.2.	Primer R1463 zur Amplifikation von <i>S. meliloti</i> und verwandten Sequenzen	41
<b>3.3</b>	<b>Etablierung einer Methode zur Auswertung von TGGE-Gelen</b>	45
<b>3.4.</b>	<b>V6-Sonden</b>	46
<b>3.5.</b>	<b>Unspezifische Bandenbildung auf der TGGE</b>	48
<b>3.6.</b>	<b>Analyse bakterieller Gemeinschaften</b>	51
3.6.1.	Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft der Rhizoplane von Luzerne	51
3.6.2.	Charakterisierung der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft der Luzerne durch eine Inokulation mit dem <i>S. meliloti</i> Wildtypstamm 2011 und dem gentechnisch veränderten Stamm L33	56
3.6.3.	Untersuchung des Ausmaßes der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation mit <i>S. meliloti</i> L33 an der Wirtspflanze Luzerne im Vergleich zu Roggen in verschiedenen Bodentypen	61
3.6.4.	Untersuchung der natürlichen Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft von Luzerne in Abhängigkeit des Alters der Wirtspflanze und bei verwandten Pflanzen	73
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	79
<b>4.1.</b>	<b>Weiterentwicklungen der TGGE-Analyse</b>	79
<b>4.2.</b>	<b>Anwendung der TGGE zur Darstellung bakterieller Gemeinschaften</b>	83
4.2.1.	Limitierungen der TGGE-Analyse	86
<b>4.3.</b>	<b>Diskussion der Gewächshausversuche: Darstellung von Veränderungen in bakteriellen Gemeinschaften anhand von TGGE-Analysen</b>	94
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	106
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	108
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	125

**meinem Vater**



## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

Heuer, H., K. Hartung, G. Wieland, I. Kramer und K. Smalla. 1999. Polynucleotide probe that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Applied Environmental Microbiology* 65: 1045-1049

R. Miethling, G. Wieland, H. Backhaus und C.C. Tebbe. Variation of microbial communities in response to crop species, soil origin and inoculation with the marker gene tagged *Sinorhizobium meliloti* L33. In Druck bei *Microbiology Ecology*

Backhaus, H., G. Wieland und A. Waberski. 1999. Erfassung der Zusammensetzung von Mikrobenpopulationen und ihrer natürlichen und induzierten Veränderung durch sequenzspezifische Trennung ribosomaler Zielsequenzen. *BioMonitor, Molekulare Mikrobiökologie; BMBF. Neuherberg*

Mogge, B., M. Lebuhn, M. Schlöter, M. Stoffels, R. Pukall, E. Stackebrandt, G. Wieland, H. Backhaus und A. Hartmann. 1999. Erfassung des mikrobiellen Populationsgradienten vom Boden zur Rhizoplane von Luzerne (*Medicago sativa*). *BioMonitor, Molekulare Mikrobiökologie; BMBF. Neuherberg*

Pukall R., A. Götz, G. Wieland, H. Backhaus, B. Mogge, A. Hartmann, S. Weidner, A. Pühler und E. Stackebrandt. 1999. Polyphasische Charakterisierung der mikrobiellen Population der Rhizoplane von Luzerne (*Medicago sativa*). *BioMonitor, Molekulare Mikrobiökologie; BMBF. Neuherberg*

Weidner, S. A. Götz, R. Pukall, E. Stackebrandt, B. Mogge, A. Hartmann, G. Wieland, H. Backhaus und A. Pühler. 1999. Einfluß eines gentechnisch veränderten *Sinorhizobium meliloti* Stammes auf die bakterielle Population in der Rhizoplane von Luzerne (*Medicago sativa*). *BioMonitor, Molekulare Mikrobiökologie; BMBF. Neuherberg*

## Tagungsbeiträge

Wieland, G., R. Miethling, C.C. Tebbe und H. Backhaus. 1998. Application of TGGE to investigate effects of released genetically engineered microorganisms on the microbial diversity in soil. Posterabstract in: Workshop on Genetic Fingerprints of Microbial Communities-present status and future perspectives. Bremen.

Wieland, G., R. Miethling, C.C. Tebbe und H. Backhaus. 1998. Variability of microbial communities in soil and effects of inoculation with a genetically marked *Sinorhizobium* strain. Posterabstract in: BIOSpektrum. VAAM Jahrestagung, Göttingen.

Backhaus, H., B. Engelen, H.P. Malkomes und G. Wieland. 1998. Environmental effects of GMO: The variation of structure and function of microbial communities studied as an endpoint of ecotoxicological testing. Poster. 5<sup>th</sup> international symposium on biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms. Braunschweig.

Wieland, G. 1999. Effect of an inoculation of a (genetically modified) microorganism on the microbial community. Vortrag. University of Rio de Janeiro, Brasilien

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert (Nr. 0311-2218, „Beobachtung der Zusammensetzung von Mikrobenpopulationen und ihrer natürlichen und induzierten Veränderungen durch Trennung und Darstellung ribosomaler Nukleinsäuresequenzen“). Durchgeführt wurde die Arbeit am Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Horst Backhaus. Ihm möchte ich danken für die Überlassung dieses spannenden Themas, für die Freiheiten, die er mir gelassen hat und für seine stetige Diskussionsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. Erko Stackebrandt danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wären nicht möglich gewesen ohne die Hilfe von Regine Neumann, die mir stets tatkräftig und mit guter Laune bei der Bewältigung der „Probenschlacht“ geholfen hat. Ihr sei besonders gedankt, ebenso wie Ina Kramer, die mich in die molekularbiologischen Methoden eingeführt hat. Mein Dank gilt auch Arne Waberski und besonders Sara Meier-Bethke für den Spaß im Labor und die gegenseitige Unterstützung in Frustphasen sowie die unzähligen Diskussionen, nicht nur über fachliche Dinge. Ohne sie wäre der Laboralltag ziemlich trist gewesen.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Smalla, vor allem Dr. Holger Heuer und Angela Zock möchte ich ebenfalls danken für das nette Arbeitsklima und die tatkräftigen Unterstützungen bei vielen Problemen rund um die TGGE, ebenso Gregor Hagedorn für seine Hilfe beim Sequenzieren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Bert Engelen und Dr. Frank Gebhard für die netten Plauderstündchen und die Tips und Tricks, nicht nur am Mac, sondern auch rund ums Labor und Braunschweig.

Für das spontane Angebot der Zusammenarbeit mit der FAL bedanke ich mich bei Dr. Christoph Tebbe und vor allem bei Dr. Rona Miethling, durch die sich mir viele Möglichkeiten aufgetan haben. Für die tolle und fruchtbare Zusammenarbeit in dem Verbundprojekt möchte ich Dr. Bernhard Mogge, Dr. Stefan Weidner, Dr. Rüdiger Pukall und Dr. Antje Götz danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Kornelia Smalla, die meiner Doktorarbeit durch die erneute Möglichkeit nach Rio de Janeiro zu gehen, einen krönenden Abschluß gab.

Abschließend möchte ich mich bei Dirk Neuber dafür bedanken, daß er immer für mich da war. Ebenso möchte ich mich bei meinem Bruder Martin und meinen Eltern bedanken, auf deren Hilfe ich immer bauen konnte und die nie eine Mühe gescheut haben, mich zu unterstützen.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ARDRA	amplified ribosomal DNA restriction analysis
BBA	Biologische Bundesanstalt Braunschweig
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy-DNA
DAPI	4,6-diamidino-phenylindol
DDT	Dithiothreitol
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis[2-aminoethyläther]N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ERIC-PCR	enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR
FAL	Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig
FAME	fatty acid methylester analysis
g	Erdbeschleunigung
gr	Gramm
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde
IS	Insertions-Sequenzen
KBE	Kolonie bildende Einheiten
mA	Milliampere
min	Minute
MOPS	3-[N-Morpholin] Propansulfonsäure
mS	Millisiemens
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RDP	Ribosomal Database Project
RF	Retentionszeit
RISA	ribosomal intergenic spacer analysis
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunde
ss-DNA	Einzelstrang-DNA
SSCP	single-strand-conformation polymorphism
SSU	small subunit (kleine Untereinheit der Ribosomen)
STM	Straßmoos

T	Temperatur
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-HCL-Puffer mit EDTA
TEMED	N,N,N';N'-Tetramethylethylendiamin
TGGE	Temperatur Gradienten-Gelelektrophorese
Tris	Tris(hydroxymethyl)methylamin
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
V	variable Region
Vol	Volumen
WT	Wildtypstamm
Z	Zellen

## 1. Einleitung

Bei den Bemühungen, die Landwirtschaft in umweltverträglicher Weise effizienter zu machen, werden zunehmend Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen als bedeutende Faktoren für Gesundheit, Wachstum und somit auch Ertrag der Pflanzen erkannt (Kloepper *et al.* 1980; Nehl *et al.*, 1996). Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Interaktionen im Bereich der Pflanzenwurzeln (Lynch, 1990). Die Wurzeln beeinflussen den sie umgebenden Boden, die Rhizosphäre, in vielfältiger Weise. So ist eine sehr große Vielfalt an chemischen Komponenten bekannt, die als Wurzelexsudate von den Pflanzenwurzeln abgegeben werden (Dandurand & Knudsen, 1997). Zudem werden während des Wurzelwachstums Zellen von der Wurzelspitze abgelöst, die als Energiequelle von Mikroorganismen genutzt werden können (Whipps, 1990). Da sich die Qualität und Quantität der verfügbaren Substrate für Mikroorganismen in der Rhizosphäre deutlich von denen im nicht durchwurzelten Boden unterscheiden, führt dies zur Etablierung einer unterschiedlichen mikrobiellen Population in diesen Habitaten (Curl & Truelove, 1986; Whipps & Lynch, 1986). Daneben wurden weitere Faktoren beschrieben, die die Zusammensetzung der mikrobiellen Rhizosphäregemeinschaft beeinflussen, wie die Wasseraufnahme durch die Pflanze, Abgabe extrazellulärer Enzyme und veränderte CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Partialdrucke in Abhängigkeit des pflanzlichen Stoffwechsels (Bramwell *et al.*, 1995). Andererseits beeinflussen auch Mikroorganismen in vielfältiger Weise die Rhizosphäre, da sie wesentlich an der Mobilisierung und Nachlieferung von Nährstoffen für die Pflanze beteiligt sind (Lynch, 1990). Durch die Abgabe von extrazellulären Enzymen, pflanzlichen Wachstumshormonen und durch Ausbildung parasitischer oder mutualistischer Beziehungen zu der Pflanze können Mikroorganismen positive oder negative Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum haben, je nachdem, welche Arten sich anreichern können (Dandurand & Knudsen, 1997; Bever *et al.*, 1997).

Aufgrund dieser komplexen Interaktionen ist ein verbessertes Verständnis der Pflanze-Bakterien Assoziation erforderlich, insbesondere dann, wenn diese Assoziationen, z. B. durch die Inokulation von Mikroorganismen, manipuliert werden sollen (Leung *et al.*, 1994; Germida *et al.*, 1998; Marilley *et al.*, 1998). So werden bei der Entwicklung neuer Konzepte zur umweltverträglichen Steigerung pflanzlicher Erträge und zum Pflanzenschutz zunehmend auch pflanzenassoziierte Mikroorganismen gentechnisch verändert (Lindow *et al.*, 1989). Aufgrund der engen Symbiose zu Leguminosen und der Fähigkeit zur Stickstofffixierung wurden und werden vor allem Bodenbakterien der Gattung *Rhizobium* und *Bradyrhizobium* untersucht, in der Hoffnung, den Einsatz von künstlichem Stickstoffdünger in der Landwirtschaft durch diese biologische Stickstofffixierung ersetzen zu können (Lindow *et al.*, 1989). Die Bakterien befinden sich bei dieser symbiontischen Beziehung in eigens von der Wirtspflanze gebildeten Organen, den Wurzelknöllchen. Sie werden von der Wirtspflanze mit Nährstoffen versorgt und geben im Gegenzug den von ihnen gebundenen Stickstoff an die Wirtspflanze ab, so daß die Pflanze von einer Stickstoffdüngung unabhängig werden kann (Vincent, 1980). Der landwirtschaftliche Nutzen dieser Symbiose wurde schon frühzeitig erkannt; die Freisetzung von entsprechenden Mikroorganismen hat in der Landwirtschaft eine mehr als 100jährige Tradition. Schätzungsweise werden heute weltweit jährlich 20 Millionen Hektar Leguminosen mit nicht-gentechnisch veränderten Rhizobien inokuliert (Hirsch & Spokes, 1988).

Um die Effektivität dieser Symbiose zu steigern, werden in neuerer Zeit gezielt gentechnische Veränderungen vorgenommen. So wurden Versuche zur Modifikation von *nif*-Genen beschrieben, die das Enzym Nitrogenase zur Stickstofffixierung kodieren, ebenso wie von *nod*-Genen, die den Wirts-

bereich und die Nodulationskapazität determinieren, von *dct*-Genen, die in dem Dicarboxylatmechanismus der Wurzelknöllchen involviert sind, von *hup*-Genen, die für Hydrogenasen kodieren oder von weiteren Genen, die an der Biosynthese von Phytotoxinen beteiligt sind (Lindow *et al.*, 1989). Einige dieser Konstrukte wurden anhand von Freisetzungen in kleinem Maßstab auf ihr Potential zur Steigerung des pflanzlichen Ertrages getestet (Amager & Delgutte, 1990; Ronson *et al.*, 1990; Drahos, 1991; Bosworth *et al.*, 1994). Die zur Zeit verfügbaren Daten lassen allerdings darauf schließen, daß nur unter sehr speziellen Bedingungen, wie Stickstoffmangel oder dem Fehlen einer endogenen Rhizobienpopulation, positive Effekte auf das Pflanzenwachstum zu erwarten sind.

Die Freisetzung rekombinanter Mikroorganismen ist allerdings derzeit in vielen Ländern eingeschränkt, da die Erkenntnisse über mögliche Risiken oder unerwünschte Effekte, die hierbei auftreten könnten, noch gering sind (van Elsas *et al.*, 1998). Besonders schwierig gestalten sich Untersuchungen über mögliche ökologische Auswirkungen in komplexen Habitaten wie Böden, weil die Grundlagenkenntnisse in der mikrobiellen Ökologie über diese Habitate noch sehr begrenzt sind (Knudsen, 1997; Øvreås & Torsvik, 1998).

In Deutschland wurden bisher nur zwei gentechnisch veränderte Mikroorganismenstämme, *Sinorhizobium meliloti* L1 und L33, freigesetzt. Die Freisetzungen erfolgten 1995 auf dem Gelände der FAL Braunschweig (Niedersachsen) und 1997 in der Nähe von Straßmoos (Bayern). *S. meliloti* lebt in Symbiose mit den Pflanzengattungen Luzerne (*Medicago*), Steinklee (*Melilotus*) und Bockshornklee (*Trigonella*) und ist ubiquitär in Bodenhabitaten verbreitet (Hartmann *et al.*, 1998). Als Symbiosepartner der wichtigen Futterpflanze Luzerne wird *S. meliloti* schon sehr lange landwirtschaftlich genutzt und ist deshalb bereits seit Jahren Gegenstand intensiver molekularbiologischer und ökologischer Forschung (Keller *et al.*, 1998). Die freigesetzten Stämme L33 und L1 wurden durch Insertion eines konstitutiv exprimierenden *luc*-Genes des amerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) in das Chromosom des Wildtypstammes *S. meliloti* 2011 hergestellt (Selbitschka *et al.*, 1992; 1995). Hierdurch sind diese Stämme in der Lage, das Enzym Luziferase zu bilden, mit dem Luziferin unter Lichtaussendung zu Oxyluziferin umgewandelt werden kann. Bei dem Stamm L1 wurde das *luc*-Gen in das *recA*-Gen integriert, was zum Funktionsverlust des *recA*-Genes führte, so daß dieser Stamm als Sicherheitsstamm untersucht werden konnte (Dammann-Kalinowski *et al.*, 1996). Der Stamm L33 unterscheidet sich außer der Biolumineszenzmarkierung nicht von dem Wildtypstamm. Entsprechend konnten auch keine veränderten physiologischen oder ökologischen Eigenschaften aufgezeigt werden (Dammann-Kalinowski *et al.*, 1996). Durch die Luziferaseaktivität kann aber im Gegensatz zu der Inokulation mit dem Wildtypstamm der veränderte Stamm eindeutig nachgewiesen werden (Selbitschka *et al.*, 1995). Dadurch ist es möglich, grundlegende Erkenntnisse über Ausbreitung und Überleben dieses spezifischen Stammes auch in sehr komplexen Bodenhabitaten zu erlangen. Zudem kann dieser Stamm als Modellorganismus dienen, mit dem mögliche Auswirkungen einer Freisetzung auf die bakterielle Gemeinschaft studiert werden können, ohne daß sicherheitsrelevante Effekte zu befürchten sind. Die bislang vorliegenden Untersuchungsergebnisse über die Inokulation dieser Stämme in einem Gewächshausversuch ergaben keine Beeinflussungen der kultivierbaren bakteriellen Bodenpopulationen anhand von Zellzahlbestimmungen und Untersuchungen der Substratverwertungsspektren durch BIOLOG-Analysen (Schwieger *et al.*, 1997).

In dieser Arbeit sollen unter anderem die Auswirkungen einer Inokulation von *S. meliloti* L33 auf die bakterielle Gemeinschaft des Bodens, der Rhizosphäre und der Wurzeloberfläche (Rhizoplane) in

Gewächshausversuchen untersucht werden. Aufgrund der hohen Komplexität der mikrobiellen Gemeinschaft gestaltet sich allerdings die Wahl geeigneter Untersuchungsmethoden generell als schwierig. So ist für physiologische und ökologische Fragestellungen die Kultivierung der entsprechenden Organismen eine grundlegende Voraussetzung. Durch Kultivierungsanalysen kann allerdings aufgrund der Selektivität der Nährmedien nur ein kleiner Teil der mikrobiellen Diversität erfaßt werden (Amann *et al.*, 1995; Liesack *et al.*, 1997). Daher werden zunehmend kultivierungsunabhängige Techniken angewendet, bei denen anhand von molekularen Markern, wie der 16S rRNA oder den entsprechenden kodierenden Genen („rRNA-Ansatz“: Olsen *et al.*, 1986; Amann *et al.*, 1995), Mikroorganismen detektiert und identifiziert werden. Pace *et al.* (1986) und Olsen *et al.* (1986) schlugen erstmals die Verwendung von 16S rRNA-Genen als molekularbiologische Marker für kultivierungsunabhängige Untersuchungen bakterieller Populationen in Umwelthabitaten vor. 16S rRNA-Moleküle stellen dabei ideale phylogenetische Marker dar, da sie ein universelles Vorkommen, strukturelle und funktionelle Konserviertheit und trotz geringer Größe eine ausreichende Sequenzdiversität aufweisen (Ludwig & Schleifer, 1994). Die umfangreiche Anwendung dieser und weiterer molekularbiologischer Techniken führte zu einer eigenen Disziplin, der molekularbiologischen Ökologie (Akkermans *et al.*, 1995).

Anhand von DNA-Reassoziationsstudien konnten Torsvik *et al.* (1990) eine sehr hohe Diversität von Bakterien in Bodenproben aufzeigen. Allerdings können mit dieser Methode, ebenso wie mit DNA/DNA-Hybridisierungen (Lee & Fuhrman, 1990; 1991) keine Aussagen über die einzelnen Mitglieder der Population gemacht werden (Muyzer *et al.*, 1996). Daneben wurden unterschiedliche Klonierungsstrategien durchgeführt, bei denen Genbibliotheken von rDNA-Fragmenten angelegt und sequenziert wurden. Hierdurch ist es – aufbauend auf Studien von Woese (Woese & Fox, 1977; Woese, 1987) – möglich, auch nicht-kultivierbare Mikroorganismen molekulartaxonomisch durch vergleichende Sequenzanalysen der rRNA einzuordnen. Seit der ersten Studie an terrestrischen Habitaten, bei der anhand von Klonbibliotheken 16S rDNA Sequenzen einer australischen Bodenprobe untersucht wurden (Liesack & Stackebrandt, 1992), erfolgten weltweit weitere Untersuchungen mit Hilfe dieser Strategie. Dies führte zum Nachweis von bisher unbekannten Bakterien (Liesack & Stackebrandt, 1992; Ward-Rainey *et al.*, 1995; Rheims *et al.*, 1996; Borneman *et al.*, 1996, Borneman & Triplett, 1997) und zu der Erkenntnis, daß die in den Klonbanken am häufigsten vorkommenden Sequenzen oft nicht den häufigsten Isolaten des selben Habitates entsprechen (Ward *et al.*, 1990; Weller *et al.*, 1991; Fuhrman *et al.*, 1992). Die Analyse von Klonbibliotheken ermöglicht tiefere Einblicke in die phylogenetische Diversität mikrobieller Gemeinschaften, allerdings sind diese Studien sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Insofern sind Untersuchungen über die Dynamik, die eine mikrobielle Gemeinschaft, z. B. durch saisonale Effekte oder Störungen des Habitates aufweisen kann, ebenso wie Analysen über einen langen Zeitraum mit diesen Techniken schwierig (Muyzer & Smalla, 1998). Für solche Fragestellungen, die sich auf die Darstellung von Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft beziehen, bietet sich die Verwendung taxon-spezifischer Sonden bei Dot-Blot-Hybridisierungen extrahierter Nukleinsäuren (z. B. Stahl *et al.*, 1988; Raskin *et al.*, 1995) oder die Hybridisierung ganzer Zellen an (Übersicht bei Amann *et al.*, 1995).

Einen weiteren alternativen Ansatz bieten die sog. Fingerprintmethoden, wie Gradienten-Gelelektrophoresen. Hierbei wird durch die Verwendung eines Gradienten denaturierender Chemikalien (DGGE) oder eines Temperaturgradientens (TGGE) in einem Polyacrylamidgel eine sequenzabhängige Auftrennung von PCR-Produkten ermöglicht. Das durch die Auftrennung amplifizierter rRNA/rDNA-Moleküle aus einem Nukleinsäureextrakt erhaltene Bandenmuster kann als



„genetischer Fingerabdruck“ der bakteriellen Gemeinschaft angesehen werden (Muyzer & Smalla, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde die Temperatur Gradienten-Gelelektrophorese verwendet, um bakterielle Populationen und deren Beeinflussungen zu beschreiben. Hierbei bieten T-/DGGE-Analysen den Vorteil der relativ schnellen und einfachen Darstellung bakterieller Populationen. Insofern kann hier der Vergleich mehrerer Proben mit vertretbarem Aufwand erfolgen, um Veränderungen in der bakteriellen Gemeinschaft durch verschiedene Beeinflussungen, z.B. einer Inokulation, darzustellen.

Neben der Erstellung von „Fingerabdrücken“ können zudem durch Sequenzierungen oder die Verwendung von Sonden einzelne Banden näher charakterisiert werden. Hierdurch ist es möglich, die erfaßten mikrobiellen Populationen näher zu beschreiben. So wurden bei relativ einfachen mikrobiellen Gemeinschaften, z. B. mikrobielle Matten heißer Quellen oder Anreicherungskulturen, einzelne T-/DGGE-Banden Isolaten oder Klonsequenzen zugeordnet (Ferris *et al.*, 1996, 1997; Teske *et al.*, 1996; Santegoeds *et al.*, 1996).

Seit der Einführung der DGGE in die mikrobielle Ökologie durch Muyzer *et al.* (1993) wurden T-/DGGE-Analysen bei einer Vielzahl von Umweltproben eingesetzt (Übersicht bei Muyzer & Smalla, 1998). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, daß T-/DGGE-Analysen eine sinnvolle Ergänzung zu anderen Methoden bei der Beschreibung mikrobieller Gemeinschaften darstellen, so z.B. in Ergänzung zu BIOLOG-Studien (Engelen *et al.*, 1998; El Fantrossie *et al.*, 1999), zu Klonbanken (Kowalchuk *et al.*, 1997; Nüsslein & Tiedje, 1998), zu Reassoziations- und ARDRA-Analysen (Øvreås *et al.*, 1998; Øvreås & Torsvik, 1998) oder zu Untersuchungen mit Mikroelektroden (Ferris *et al.*, 1997; Santegoeds *et al.*, 1998). Daneben stellt die Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften anhand von funktionellen Genen (Wawer & Muyzer, 1995; Rosado *et al.*, 1998) eine weitere sinnvolle Erweiterung des Anwendungsspektrums denaturierender Gradientengele dar. In neuerer Zeit werden auch andere Fingerprintmethoden zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften angewendet. So wurden interessante Ansätze durch SSCP-Analysen an Boden- und Rhizosphärenhabitaten (Schwieger & Tebbe, 1998) oder durch RISA-Analysen an Bodenproben demonstriert (Borneman & Triplett, 1997).

Der überwiegende Teil der bisher durchgeführten Fingerprintanalysen beschäftigt sich mit der Untersuchung von rDNA aus Umwelthabitaten, die Aussagen über die Präsenz mikrobieller Mitglieder der Gemeinschaft zuläßt (Muyzer & Smalla, 1998). Einen alternativen Ansatz bietet hierzu die in dieser Arbeit als Schwerpunkt durchgeführte Analyse der 16S rRNA-Fraktion, da angenommen wird, daß hierdurch die Aktivität der bakteriellen Gemeinschaft reflektiert wird (Ward *et al.*, 1992). Die zugrundeliegende Vermutung, daß das Verhältnis der 16S rRNA zur rDNA von der zellulären Aktivität abhängig ist, beruht auf einer Vielzahl von Studien, bei denen gezeigt werden konnte, daß der Ribosomengehalt und damit der rRNA-Gehalt linear oder zumindest annäherungsweise proportional zur Wachstumsrate verschiedenster Mikroorganismen ist (Rosset *et al.*, 1966; Dortch *et al.*, 1983; Bremer & Dennis, 1987; DeLong *et al.*, 1989; Srivastava & Schlessinger, 1990; Neidhardt *et al.*, 1990; Kerkhof & Ward, 1993; Poulsen *et al.*, 1993; Wagner, 1994; Binder & Liu, 1998). Da theoretisch die gleiche Menge an Ribosomen aus einer bestimmten Population erhalten werden kann, wenn die Population zwar zahlenmäßig dominiert, aber nur eine geringe Aktivität aufweist oder wenn die Population nur eine geringe Zelldichte, dafür aber eine sehr hohe Aktivität aufweist, schlugen Ward *et al.* (1992) vor, die Abundanz der Ribosomen einzelner mikrobieller Mitglieder als eine Funktion der Anzahl der einzelnen individuellen Zellen und ihrer Wachstumsrate zu verstehen.

Erstmals bei T-/DGGE-Analysen wurde dieser rRNA-Ansatz von Teske *et al.* (1996b) bei der

Untersuchung sulfatreduzierender Bakterien in einem dänischen Fjord angewandt. Hierbei konnten zwei starke Banden nur in dem RNA-Muster, jedoch nicht in dem DNA-Muster aufgezeigt werden, woraus die Autoren schlossen, daß hier zwei bakterielle Populationen mit sehr hoher Aktivität, aber nur geringer Zellzahl vorlagen. Daneben erfolgten weitere rRNA-T/DGGE Analysen bisher nur an wenigen weiteren Habitaten, wie im menschlichen Gastrointestinaltrakt (Zoetendal *et al.*, 1998) und in einem niederländischen Bodenareal (Felske *et al.*, 1997, 1998), wobei die Autoren durch den Vergleich der rDNA- und rRNA-Muster ebenfalls Rückschlüsse auf die unterschiedliche Struktur und Aktivität einzelner bakterieller Populationen zogen.

Allerdings ist bei einem Vergleich der rRNA-Muster die zeitliche Komponente zu berücksichtigen. So wurde in mehreren Arbeiten eine zeitliche Verzögerung des Ribosomenab- und aufbaus zu Beginn und am Ende einer Hungerphase in Abhängigkeit der untersuchten Bakterienspezies und dem physiologischen Zustand der Zellen beschrieben (Flärdh *et al.*, 1992; Kramer & Singleton, 1992; Wagner *et al.*, 1995; Fegatella *et al.*, 1998). Insgesamt erfolgte nach den bisherigen Studien die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen wie Nährstoffverfügbarkeit oder Tag-Nacht-Zyklen bei phototrophen Organismen (Kramer & Singleton, 1993) durch einen veränderten Ribosomengehalt in einem relativ engen Zeitraum, auch wenn die Adaptation wenige Tage dauern kann. Die in dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen erstreckten sich über erheblich längere Zeiträume; Beeinflussungen in der bakteriellen Gemeinschaft durch verschiedene Faktoren wurden erst im Abstand von mehreren Wochen durch den Vergleich der resultierenden TGGE-Muster analysiert.

Bei der Interpretation der rRNA-Muster ist zudem zu bedenken, daß der Ribosomengehalt bei verschiedenen Spezies in der gleichen Wachstumsphase unterschiedlich groß sein kann (Fegatella *et al.*, 1998). Beispielsweise wiesen exponentiell wachsende *E. coli*-Zellen bei einer Generationszeit von 100 min ca. 6700 Ribosomen auf (Bremer & Dennis, 1987), demgegenüber konnten in nicht-wachsende *Vibrio*-sp. Zellen nach 96 h Hungerzeit bedingt durch Kohlenstoffmangel noch ca. 8000 Ribosomen pro Zelle nachgewiesen werden (Flärdh *et al.*, 1992). Eine Änderung im RNA bzw. Ribosomengehalt einer Zelle weist jedoch auf eine veränderte physiologische Aktivität hin (Neidhardt *et al.*, 1990). Insofern ist anzunehmen, daß die bei einem Vergleich von TGGE-Mustern detektierbaren Änderungen im RNA-Gehalt einer bestimmten Population Rückschlüsse auf die Beeinflussung der Aktivität und / oder der Abundanz einzelner bakterieller Mitglieder zulassen. Aufbauend auf dieser Annahme wurden auch in dieser Arbeit RNA-TGGE-Muster verglichen, um Veränderungen in bakteriellen Populationen darzustellen.

Allerdings gestaltet sich der Vergleich einer Vielzahl von Bandenmustern als schwierig. Eine Möglichkeit der Darstellung von Veränderungen in TGGE-Bandenmustern ist die Berechnung von Diversitätsindices, die bei ökologischen Fragestellungen häufig angewendet wird (Atlas, 1984). Eichner *et al.* (1999) berechneten die aus dem TGGE-Muster resultierende Diversität durch den Shannon-Index anhand der Anzahl und relativen Intensität der Banden eines Musters. Die Autoren konnten dabei eine deutliche Abnahme der Diversität in einer Aktivschlammprobe als Folge einer Phenolbehandlung aufzeigen, da die Komplexität der Bandenmuster drastisch reduziert wurde. Wenn allerdings als Folge einer Beeinflussung der mikrobiellen Gemeinschaft die Komplexität des Bandenmusters nicht beeinflußt wird, sondern z.B. einige der auf der TGGE darstellbaren Sequenzen in ihrer Abundanz zunehmen, während andere abnehmen, so sind diese Änderungen nicht durch die Berechnung von Diversitätsindices darstellbar (Mahaffee & Klöpper, 1997).

Um auch diese, in der Regel weniger drastischen Änderungen in den T-/DGGE-Mustern zu erfassen, war es ein Teilaspekt dieser Arbeit, die Gelauswertung in Form von Dendrogrammen durchzuführen.

Hierbei sollten die relativen Musterverwandtschaften dargestellt werden, wobei neben der Einbeziehung des spezifischen Migrationsverhaltens und der Anzahl der Banden auch deren Intensität zu berücksichtigen war. Bei der oben erwähnten Untersuchung von Aktivschlammproben (Eichner *et al.*, 1999) konnte das vielversprechende Potential dieses Ansatzes bei Verwendung einer vergleichbaren Auswertungssoftware schon ansatzweise gezeigt werden.

Grundsätzlich ist bei der Beschreibung mikrobieller Gemeinschaften und deren Beeinflussung durch Fingerprintmethoden zu berücksichtigen, daß diese Methoden Limitierungen und mögliche Fehlerquellen aufweisen (Muyzer & Smalla, 1998). Ein Aspekt dieser Arbeit war daher die Optimierung und Weiterentwicklung der TGGE-Methodik, unter anderem durch die Entwicklung neuer Primerkombinationen, durch die das Beobachtungsfenster der Analysen variiert werden kann. Ein anderer Schwerpunkt lag auf der Untersuchung von Limitierungen, die die Darstellung der bakteriellen Gemeinschaft und ihrer Veränderung begrenzen. Besonders wichtig ist dies, wenn die Untersuchungsmethoden – wie in der vorliegenden Arbeit – im Rahmen der Sicherheitsforschung angewendet werden, da eventuell vorhandene und möglicherweise sicherheitsrelevante Effekte einer Freisetzung von modifizierten Organismen nicht detektiert werden können.

In neuerer Zeit hat sich zunehmend die Erkenntnis durchgesetzt, daß Untersuchungen in einem polyphasischen Ansatz erfolgen sollten, um mikrobielle Populationen und deren Beeinflussung möglichst umfassend zu beschreiben (Liesack *et al.*, 1997; Santegoeds *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde daher die TGGE-Analyse in das Verbundprojekt „Vergleichende Analyse der mikrobiellen Population in der Rhizosphäre von Luzerne mit und ohne Beeimpfung durch *Sinorhizobium meliloti* Wildtyp und gentechnisch veränderter Stämme“ (Bundesministerium für Bildung und Forschung, Projektnr. 0311-224 bis 226) einbezogen. In diesem Projekt wurden die mikrobiellen Populationen der Luzernewurzeln zusätzlich durch Anlegen von Klonbanken (S. Weidner, A. Pühler; Universität Bielefeld), fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen und laserscanning-mikroskopische Untersuchungen (B. Mogge, M. Lebuhn, A. Hartmann; GSF-Neuherberg) sowie durch kultivierungsabhängige Studien (R. Pukall, A. Götz, E. Stackebrandt; DSMZ Braunschweig) untersucht. Hierbei bot ein Vergleich der Ergebnisse der Charakterisierung der TGGE-Bandenmuster mit denen der anderen Untersuchungsmethoden zudem die Möglichkeit, zu untersuchen, in welchem Ausmaß TGGE-Analysen geeignet sind, die bakterielle Gemeinschaft eines Habitates darzustellen. Die Untersuchungen erfolgten in zwei aufeinanderfolgenden Jahren, wobei im ersten Jahr die Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaften der Habitate Boden, Rhizosphäre und schwerpunktmäßig der Rhizoplane von Luzerne durchgeführt wurde. Im folgenden Jahr wurden Luzernepflanzen zusätzlich mit dem *S. meliloti* Wildtypstamm 2011 und dem gentechnisch markierten Stamm L33 inokuliert und die bakteriellen Gemeinschaften im Vergleich zu denen von nicht-inokulierten Luzernehabitaten analysiert, um die Auswirkungen einer Inokulation auf die bakterielle Gemeinschaft zu untersuchen.

Eine Bewertung der detektierbaren Auswirkungen auf die bakterielle Gemeinschaft gestaltet sich allerdings derzeit als schwierig, unter anderem deshalb, weil erst wenig über die Variabilität mikrobieller Gemeinschaften bekannt ist (Doyle *et al.*, 1995). Aus diesem Grund erfolgten zusätzliche Untersuchungen über das Ausmaß der Veränderungen in bakteriellen Gemeinschaften durch natürliche Faktoren. Hierdurch sollte es möglich sein, die ermittelte natürliche Variabilität in Relation zu den Auswirkungen einer Inokulation mit *S. meliloti* L 33 zu setzen. Als natürliche Faktoren, die die

bakterielle Gemeinschaft beeinflussen können, wurden die Pflanzenart, der Boden und die Auswirkungen der zeitliche Entwicklung von Luzerne untersucht. Die Beeinflussungen durch den Faktor Pflanze wurde anhand von TGGE-Untersuchungen der bakteriellen Gemeinschaft von Luzerne im Vergleich zu denen anderer Leguminosen (Bohne und Klee) und Nicht-Leguminosen (Roggen) ermittelt. Die verwendeten Bodentypen unterschieden sich in ihrem endogenen *Sinorhizobium*-Titer, um zusätzlich das Vorhandensein einer endogenen Population auf die Auswirkungen einer Inokulation zu untersuchen (siehe Stacey, 1985). Aufgrund des großen Probenumfangs war bei dieser Untersuchung die Charakterisierung einzelner TGGE-Banden nicht möglich, so daß hier der Vergleich der TGGE-Muster anhand von Clusteranalysen erfolgte. Diese Studien wurden ebenfalls in Gewächshäusern durchgeführt und erfolgten in Zusammenarbeit mit der FAL Braunschweig (R. Miethling, C. Tebbe). In dieser Arbeitsgruppe wurden die Auswirkungen einer Inokulation mit L33 auf die bakterielle Gemeinschaft der Rhizosphäre von Roggen und Luzerne in den verschiedenen Bodentypen anhand von BIOLOG- und FAME-Analysen untersucht. Durch den Vergleich der Ergebnisse dieser „Community-level“-Methoden mit denen der TGGE bot sich zudem die Möglichkeit, die Anwendbarkeit bzw. die Aussagekraft der Clusteranalysen von TGGE-Bandenmustern bei ökologischen oder sicherheitsrelevanten Fragestellungen darzustellen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchsansätze

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bakterieller Gemeinschaften erfolgten in Gewächshausversuchen, in denen Pflanzen in drei verschiedenen landwirtschaftlich genutzten Böden angezogen und zu unterschiedlichen Zeiten beprobt wurden. Die Böden stammten von einer Versuchsfläche auf dem Gelände der Forschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig („FAL-Boden“), einer Versuchsfläche auf dem Gelände der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig („BBA-Boden“) und einer Versuchsfläche in Straßmoos (Niederbayern, „STM-Boden“). Neben den Kennzahlen der Versuchsböden (s. Tab. 1) unterschieden sich die Böden auch in ihrer landwirtschaftlichen Nutzung. Während im Jahr zuvor der FAL- und der BBA-Boden brach lagen, wurde auf dem STM-Boden Luzerne angebaut.

Da der FAL-Boden in allen durchgeführten Versuchsansätzen verwendet wurde, erfolgte die Bodenentnahme jeweils in demselben Bereich der Versuchsfläche. Ebenso wurden in allen Versuchen Luzernesamen (*Medicago sativa* var. Europe) derselben Charge benutzt. Zur Befüllung der Mikrokosmen wurden die jeweiligen Böden aus den obersten 0-15 cm (A<sub>p</sub>-Horizont) der Versuchsfelder entnommen und mittels eines mit Ethanol (70%) gesäuberten Spatens durchmischt, grobe Partikel wie Steine und Pflanzenwurzeln (hauptsächlich Löwenzahn und verschiedene Süßgräser) entfernt und gleichmäßig auf die Mikrokosmen verteilt. Nach 24 h Lagerung in den Gewächshäusern wurden die nicht oberflächensterilisierten Pflanzensamen ausgesät.

Insgesamt wurden zwei mal zwei aufeinander aufbauende Versuchsansätze mit folgenden Untersuchungsschwerpunkten durchgeführt:

- Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft der Rhizoplane von Luzerne
- Charakterisierung der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft der Luzerne durch eine Inokulation mit dem *S. meliloti* Wildtypstamm 2011 und dem gentechnisch veränderten Stamm L33
- Untersuchung des Ausmaßes der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation mit *S. meliloti* L33 an der Wirtspflanze Luzerne im Vergleich zu Roggen in verschiedenen Bodentypen
- Untersuchung der natürlichen Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft von Luzerne in Abhängigkeit des Alters der Wirtspflanze und bei verwandten Pflanzen

#### • Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft der Rhizoplane von Luzerne

Im Rahmen des Verbundprojektes „Vergleichende Analyse der mikrobiellen Population in der Rhizosphäre von Luzerne mit und ohne Beimpfung durch *Sinorhizobium meliloti* Wildtyp und gentechnisch veränderten Stämmen“ wurde zunächst die bakterielle Gemeinschaft der Luzerne näher charakterisiert und anschließend mögliche, durch eine Inokulation mit *S. meliloti* bedingte Veränderungen in den bakteriellen Gemeinschaften analysiert.

Hierzu wurde im ersten Jahr Luzerne in kleinen Mikrokosmen (6x6x8 cm) in je ca. 220 gr FAL-

Boden angezogen, wobei 4 Samen je Topf ausgesät wurden. Nach 6 Wochen Wachstum in einem Gewächshaus der Universität Bielefeld erfolgte die Probenahme (Kap. 2.2).

- **Charakterisierung der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaften der Luzerne durch eine Inokulation mit dem *S. meliloti* Wildtypstamm 2011 und dem gentechnisch veränderten Stamm L33**

Ausgehend von der im ersten Jahr erfolgten Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft innerhalb dieses Verbundprojektes wurde im folgenden Jahr in einem Gewächshaus der GSF Neuherberg Luzerne unter vergleichbaren Bedingungen ebenfalls in FAL-Boden angezogen. Zusätzlich wurde jeweils ein Drittel der Mikrokosmen mit dem Wildtypstamm *S. meliloti* 2011 bzw. mit dem gentechnisch veränderten Stamm L33 inokuliert. Hierzu wurden die Zellen durch B. Mogge nach Anzucht in TY-Flüssigmedium abzentrifugiert und in sterilem Leitungswasser aufgenommen. Durch vorsichtiges Ausgießen der Suspension auf die Bodenoberfläche erfolgte die Inokulation für beide Stämme mit je  $10^6$  Z/gr Boden Feuchtgewicht ( $=2,2 \times 10^8$  Z/Mikrokosmos).

Nach 6 Wochen erfolgte die Probenahme und -aufarbeitung wie im Vorjahr.

- **Untersuchung des Ausmaßes der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation mit *S. meliloti* L33 an der Wirtspflanze Luzerne im Vergleich zu Roggen in verschiedenen Bodentypen**

In Kooperation mit R. Miethling (FAL Braunschweig) wurde im ersten Jahr ein Gewächshausversuch auf dem Gelände der FAL durchgeführt, in dem in großen Mikrokosmen (ca. 40x30x20cm) zwei verschiedene Bodentypen (FAL- und STM-Boden) mit je zwei verschiedenen Pflanzen – Luzerne und Roggen (*Secale cereale*) – beprobt wurden. Zur besseren Durchwurzelung des Bodens und zur Vermeidung von Staunässe wurde zunächst eine ca. 5 cm hohe Kiesschicht (Kiesdurchmesser ca. 3-4 cm) in die Mikrokosmen gefüllt, welche anschließend mit je ca. 36 kg des entsprechenden Bodens gefüllt wurden. Pro Mikrokosmos wurden 12,5 gr Roggensamen (ca. 500 Samen) bzw. 2 gr Luzernesamen (ca. 1000 Samen) ausgesät. Jeweils die Hälfte der Mikrokosmen wurde zusätzlich mit dem gentechnisch veränderten Stamm *Sinorhizobium meliloti* L33 inokuliert. Hierzu wurden die Zellen durch R. Miethling nach Anzucht in R2A-Medium zentrifugiert, in sterilem Leitungswasser aufgenommen und eine Zellzahl von ca.  $2,4 \times 10^8$  Z/ml eingestellt. Die Inokulation der entsprechenden Mikrokosmen erfolgte durch vorsichtiges Ausbringen von 150 ml Zellsuspension pro Mikrokosmos, was  $10^6$  Z/gr Boden Feuchtgewicht bzw.  $3,6 \times 10^{10}$  Z/Mikrokosmos entsprach. Ein Kontrollansatz z.B. mit autoklavierten Zellen wurde nicht durchgeführt, da angenommen wurde, daß nach einem mehrwöchigen Wachstum Effekte durch den Nährstoffeintrag der inokulierten Zellen an sich nicht mehr relevant sind, zumal die Zellen zuvor in Wasser aufgenommen wurden.

Insgesamt lagen somit folgende Versuchsvarianten vor:

- Luzerne in FAL-Boden, nicht-inokuliert und inokuliert mit *S. meliloti* L33;
- Luzerne in STM-Boden, nicht-inokuliert und inokuliert mit *S. meliloti* L33;
- Roggen in FAL-Boden, nicht-inokuliert und inokuliert mit *S. meliloti* L33;
- Roggen in STM-Boden, nicht-inokuliert und inokuliert mit *S. meliloti* L33.

Jede Versuchsvariante wurde in 4 Parallelen durchgeführt, wobei die insgesamt 32 Mikrokosmen als randomisierte Blockanlage angeordnet wurden. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die nicht-inokulierten von den mit L33 inokulierten Mikrokosmen durch eine Trennwand räumlich getrennt.

Nach 10 Wochen, zum Zeitpunkt der Blüte der Luzernepflanzen, erfolgte die Probenahme der Luzernemikrokosmen, nach 11 Wochen die der Roggenmikrokosmen (s. Kap. 2.2).

• **Untersuchung der natürlichen Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft von Luzerne in Abhängigkeit des Alters der Wirtspflanze und bei verwandten Pflanzen**

Aufbauend auf diesem Versuch wurde im zweiten Jahr ein Gewächshausversuch auf dem Gelände der BBA durchgeführt, um die Variabilität der bakteriellen Gemeinschaften einerseits im Verlauf des Wirtspflanzenwachstums und andererseits an nahe verwandten Pflanzen wie Bohne (*Phaseolus vulgaris*, var. Tilla) und Rotklee (*Trifolium pratense*) als weiteren Leguminosen zu untersuchen. Zusätzlich wurde als weiterer Bodentyp BBA-Boden mit in die Untersuchungen einbezogen. Um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit im Vergleich zu dem im Vorjahr durchgeführten Versuch zu gewährleisten, wurde der FAL- Boden im gleichen Monat und bei vergleichbaren Feuchtigkeitsverhältnissen vom Versuchsfeld entnommen und in die oben beschriebenen, großen Mikrokosmen gefüllt. Ebenso wurden soweit als möglich identische Gewächshausbedingungen eingestellt. Die Aussaat von Klee und Bohne erfolgte analog zu den Luzerne-Mikrokosmen, wobei 2,5 gr Kleesamen (ca. 1000 Samen) bzw. 24 Bohnensamen im FAL-Bodentyp ausgesät wurden.

Folgende Versuchsvarianten wurden, jeweils in 4 Parallelen, durchgeführt:

- Luzerne in FAL-Boden, Beprobung nach 2, 4, 6, 8 und 10 Wochen;
- Luzerne in BBA-Boden, Beprobung nach 10 Wochen;
- Bohne in FAL-Boden, Beprobung nach 8 Wochen;
- Klee in FAL-Boden, Beprobung nach 11 Wochen.

Die relativ frühe Beprobung der Mikrokosmen mit Bohnen ergab sich durch die sehr schnelle Entwicklung der Pflanzen, die schon in der 8. Woche teilweise erste Anzeichen von Welke aufwiesen. Die Anordnung der insgesamt 32 Mikrokosmen erfolgte auch hier in Form einer randomisierten Blockanlage.

Tab. 1: Kennzahlen der Versuchsböden

	FAL-Boden	STM-Boden	BBA-Boden
Bodentyp	Parabraunerde auf Sand	Braunerde auf sandigem Lehm	lehmiger Sand
Nitrat [mg N/kg Boden]	1,23-4,31*	61,91	2,03
Ammonium [mg N/kg Boden]	0,41-2,62*	2,36	0,4
pH	6,5	5,9	5,6
Organischer Kohlenstoff	7,94	9,62	n.u.

n.u.: nicht untersucht

\* Die Werte geben die Schwankungsbreite der Stickstoffwerte im FAL-Boden bei den verschiedenen Versuchsansätzen wieder.

## 2.2 Probenahme

In allen Versuchsansätzen wurden jeweils die Fraktionen Boden, Rhizosphäre und Rhizoplane untersucht.

Obwohl die Rhizosphäre als der von den Pflanzenwurzeln beeinflusste Bodenbereich definiert wird, gestaltet sich die Betrachtung dieser Region getrennt von der Rhizoplane und vom nicht durchwurzelten Boden experimentell schwierig, da sich dieser Bereich in der Regel nur über wenige Millimeter erstreckt und zudem eine relativ große Dynamik im Verlauf der pflanzlichen Wachstumsphase aufweist (Campbell & Greaves, 1990). Die Definition der unterschiedlichen Habitate ist somit durch die jeweilige Methodik zur Gewinnung der Bakterien aus den entsprechenden Habitaten bedingt (Tate, 1995; Mahaffee & Kloepper, 1997). In dieser Arbeit wurden die Habitate Rhizosphäre und Rhizoplane durch ein Extraktionsprotokoll definiert, welches im Rahmen des Verbundprojektes entwickelt wurde. Die Effizienz der Extraktion, d.h. die Ablösung der Bakterien von der Wurzeloberfläche, wurde anhand von Laserscanning-mikroskopischen Analysen an der GSF Neuherberg dargestellt. Es zeigte sich, daß auch fest an der Wurzeloberfläche anhaftende Bakterien durch die bei dieser Methode erfolgte mehrfache mechanisch-chemische Extraktion zur Gewinnung der Rhizoplanefraktion sehr effizient abgetrennt werden konnten. Zellzahlbestimmungen der extrahierten Bakterien der verschiedenen Extraktionsschritte ergaben, daß ca. 90% aller Bakterien von der Wurzeloberfläche ablösbar waren. Zudem bestätigten DAPI-Färbungen, daß nach erfolgter Waschprozedur nur noch in den seltensten Fällen Bakterien auf der Wurzel nachgewiesen werden konnten (B. Mogge, pers. Mitteilung).

Hierbei wurden neben mechanischen Verfahren (Stomacher-Blender) zur Ablösung von Bakterien von der Wurzeloberfläche auch chemische Agenzien eingesetzt: Chelex 100 (Bio-Rad, München) führt zu einer Änderung der polyvalenten Kationenkonzentration durch Austausch von polyvalenten Kationen, die an Bodenkolloiden adsorbiert sind, gegen monovalente Kationen. Die Kombination dieses Ionen-Austauschers mit den ebenfalls verwendeten Detergenzien Natriumcholat und PEG (Polyethylenglykol), die eine Ablösung von hydrophoben (z.B. lipopolysaccharid- und lipidhaltigen) Materialien bewirken, führt zur Dispersion von Bodenpartikeln und zur Ablösung von Zellen ohne stärkere Beschädigung (Bakken & Lindahl, 1995).

In den Versuchsansätzen bei Verwendung kleiner Mikrokosmen im Rahmen des Verbundprojektes wurden je Versuchsvariante (nicht inokuliert, inokuliert mit L33 bzw. WT 2011) sowohl der Boden als auch die Pflanzenwurzeln aus den entsprechenden Mikrokosmen jeweils vereint und daraus eine Sammelmischprobe gewonnen, die an die einzelnen Projektpartner aufgeteilt wurde.

Bei Verwendung der großen Mikrokosmen wurden die jeweils vier parallelen Versuchsvarianten hingegen nicht vermischt, sondern es wurden unabhängige parallele Aufarbeitungen durchgeführt, indem aus jedem Mikrokosmos der Boden bzw. die Pflanzenwurzeln jeweils in Form von Sammelproben gewonnen wurden. Hierbei wurden die Wurzeln vorsichtig aus den Böden herausgelöst und der Boden soweit wie möglich abgeschüttelt. Jeweils getrennt nach Mikrokosmen wurde zusätzlich das Feucht- und Trockengewicht der nicht für die Aufarbeitung benötigten Wurzeln und Sprosse ermittelt. Zudem wurde in diesen Versuchsansätzen auch das Ausmaß der Wurzelnodulation bestimmt. Hierzu wurden von 10 Pflanzenwurzeln aus jedem Mikrokosmos (40 Wurzeln pro Versuchsvariante) das Verhältnis der nodulierten zu den nicht-nodulierten Wurzeln bestimmt.



Die Aufarbeitung der verschiedenen Fraktionen erfolgte in allen Versuchsansätzen in gleicher Weise: Nachdem in Vorversuchen empirisch die einzusetzende Probenmenge für eine erfolgreiche Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften der Fraktionen Rhizosphäre und Rhizoplane ermittelt worden war, wurden 4 gr mittels einer sterilen Schere in kleinere Stücke unterteilte Wurzeln in Falcon-Röhrchen eingewogen und zweimal in 40 ml NaCl-Lösung (0,89%) 2 min horizontal geschüttelt. Die beiden Überstände wurden vereint und filtriert (Porengröße 0,8 mm), um feinere Wurzeln abzutrennen. Das nach der anschließenden Zentrifugation (4°C, 8000 g, 10 min) gewonnene Pellet stellte die Fraktion der Rhizosphäre dar.

Zur Gewinnung der Rhizoplane-Fraktion wurden die so gewaschenen Wurzeln in einen sterilen Stomacherbeutel überführt, mit 20 ml 0,1% Na-Cholat versetzt und zweimal 120 sec auf höchster Stufe im Stomacher-Blender (Stomacher 400, Seward) homogenisiert. Bei der Aufarbeitung der Rhizoplanefraktionen aus den kleinen Mikrokosmen im Rahmen des Verbundprojektes wurden allerdings die gewaschenen Wurzeln in jeweils ein-Gramm-Portionen in sterile Stomacherbeutel überführt, mit den beschriebenen Lösungsvolumina behandelt und anschließend die entsprechenden Homogenisate vereint.

Die Homogenisate mit den Wurzeln wurden in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 0,4 gr Chelex-100 und 0,5 gr PEG-6000 überführt und 1 h bei 4°C gerührt. Die erhaltenen Überstände wurden auf Eis gelagert und die Wurzeln erneut zweimal wie beschrieben im Stomacher-Blender homogenisiert und 1 h gerührt, wobei bei diesen beiden Behandlungen den Erlenmeyerkolben nur noch 0,5 gr PEG zugesetzt wurde. Die erhaltenen Überstände wurden vereint und durch sterile Gaze (70 µm) filtriert. Zur Abtrennung feiner Wurzelhaare wurde bei den Probenaufarbeitungen im Rahmen des Verbundprojektes eine weitere Filtration durch Spritzenfilter (5µm) vorgenommen. Dieses war auf Grund des stark vergrößerten Probenumfangs aus technischen Gründen bei den beiden anderen Versuchsansätzen nicht möglich. Die Filtrate wurden anschließend 10 min (4°C, 8000 g) zentrifugiert und das so gewonnene Pellet als Rhizoplanefraktion bezeichnet.

Für die Analyse der Bodenfraktion wurde nach Entnahme der Pflanzenwurzeln der verbleibende Boden mit einer Schaufel durchgemischt. Der Boden wurde gesiebt (Siebporengröße: 0,8 mm) und je 2 gr für die Nukleinsäureextraktion eingesetzt.

Die Lösungen bzw. Pellets wurden während aller Arbeitsschritte gekühlt gelagert, wobei eine längere Lagerung vermieden wurde, um einen möglichen Abbau von Ribosomen in den Bakterien einzuschränken. Aus diesem Grund erfolgte auch direkt im Anschluß die Extraktion der Nukleinsäuren, wobei aus den gewonnen Boden-, Rhizosphäre- und Rhizoplanefraktionen sowohl RNA als auch DNA extrahiert wurde.

## **2.3 Nukleinsäureextraktionen**

### **2.3.1 Extraktion von Ribosomen zur Gewinnung von rRNA**

Wie bei der Extraktion von DNA sind auch für die Extraktion von rRNA aus Umweltproben verschiedene Protokolle publiziert (Hahn *et al.*, 1990; Moran *et al.*, 1993, Selenska-Pobell, 1995). Das hier angewendete Protokoll zur Gewinnung von rRNA wurde von A. Felske (Felske *et al.*, 1996) entwickelt. Durch die Extraktion von Ribosomen kann rRNA von hoher Reinheit gewonnen werden,

zudem bietet es die Möglichkeit einer parallelen Direktextraktion von genomischer DNA. Nach nicht erfolgreichen Anwendungen anderer Protokolle zur Extraktion von RNA wurde zu Beginn dieser Arbeit dieses Protokoll so modifiziert, daß auch aus verschiedenen Bodentypen rRNA in zufriedenstellender Qualität und Quantität gewonnen werden konnte.

Im folgenden sei ein kurzer Überblick über das Protokoll gegeben: Die Ribosomen wurden durch Zellaufschluß in einem Zellhomogenisator („Bead-Beater“) freigesetzt und in einem Puffer durch die Anwesenheit von Magnesiumionen und Polyvinylpyrrolidon (PVP) stabilisiert. Als Blockierungs-Reagenz für Huminsäuren wurde zusätzlich Rinderserumalbumin eingesetzt. Durch sukzessive Zentrifugation erfolgte die Abtrennung eines Großteils der Bodenmatrix und eine Aufkonzentrierung der Ribosomen. Nach Phenolextraktionen und Ethanolpräzipitation konnte die so gewonnene rRNA in der Regel direkt in enzymatische Prozesse eingesetzt werden.

Extraktionsprotokoll für die Isolierung von rRNA (mod. nach Felske *et al.*, 1996):

<u>TPM-Puffer</u>		<u>BSA-Additiv</u>	
Tris-HCL (pH 7,5)	50 mM	Rinderserum-Albumin, Fraktion V	10%
Polyvinylpyrrolidon 25	1,7%	in TPM-Puffer	
Magnesiumchlorid	10 mM		
<u>TN 150-Puffer</u>		<u>VRC-Lösung</u>	
Tris-HCL, pH 8,0	10 mM	Vanadyl-Ribonukleosidkomplex	200 mM
Natriumchlorid	150 mM	(Fluka, Deisenhofen)	
<u>TMC-Puffer</u>		<u>DNase-Lösung</u>	
Tris-HCL, pH 7,5	10 mM	DNase aus Kälber-Pankreas	1 U/μl
Magnesiumchlorid	5 mM	(Promega, Madison, USA)	
Cäsiumchlorid	0,1 mM	<u>Natriumacetat Lösung</u>	
		Natriumacetat, pH 5,5	3 M
Phenol(pH4,5)/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 Vol/Vol/Vol)			

Um eine mögliche Aktivität von RNasen zu minimieren, wurden alle Arbeitsschritte bei der Isolierung von RNA gekühlt durchgeführt, ebenso wurden alle Lösungen mit Diethylpyrocarbonat- (DEPC) behandeltem Wasser angesetzt und anschließend sterilisiert. Alle benötigten Gefäße und Materialien wurden mit RNase-hemmenden Detergenzien („RNase-away“ Roth, Karlsruhe) behandelt und vor dem Sterilisieren mit DEPC-behandeltem Wasser gespült.

(I) Zellaufschluß und Abtrennung von Bodenresten:

Sterile, mit 4 gr Glasperlen (170-180 μm) gefüllte „Bead-Beater“-Schüttelflaschen wurden mit 5 ml TPM-Puffer, 250 μl BSA-Additiv und der entsprechenden Probe befüllt (2 gr Boden bzw. das aus der Waschung von 4 gr Wurzeln resultierende Pellet der Fraktionen Rhizosphäre und Rhizoplane) und im Eisbad vorgekühlt. Der Zellaufschluß erfolgte innerhalb von 90 sec im MSK-Zellhomogenisator (Braun, Melsungen) bei 4.000 U/min. Das Lysat wurde in vorgekühlte Zentrifugen-

röhrchen (Polycarbonat-Röhrchen, 16 ml) überführt und weitere Lysatreste mit TPM-Puffer aus der Schüttelflasche gewaschen und dazugegeben. Mittels Zentrifugation (15.000 g, 15 min, 4°C) wurden Glasperlen, Bodenpartikel und Zellreste abgetrennt und der Überstand zur weiteren Entfernung von Bodenpartikeln und Huminstoffen erneut zentrifugiert (30.000 g, 30 min, 4°C).

#### (II) Ribosomen-Isolierung:

Der erhaltene Überstand wurde vorsichtig in Ultrazentrifugationsröhrchen (Polyallomer-Röhrchen, 11 ml) überführt und die Ribosomen durch eine Ultrazentrifugation (100.000 g, 135 min, 2°C) pelletiert. Der Überstand wurde zur Extraktion genomischer DNA verwendet (s. parallele DNA-Gewinnung, Kap. 2.3.2).

Die Ultrazentrifugationsröhrchen mit den Ribosomen-Pellets wurden mit 490 µl TN 150-Puffer und 10 µl VRC-Lösung sowie einem kleinen Magnet-Rührkern versetzt. Durch vorsichtiges Rühren (etwa 30-45 min) auf einem Magnetrührer wurde das Pellet in einem Eisbad suspensiert.

#### (III) Gewinnung ribosomaler RNA:

Die Ribosomen-Suspension wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt, mit 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt, mehrfach invertiert und die Phasen anschließend in einer Tischzentrifuge getrennt (13.000 U/min, 5 min). Die wäßrige Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt, mit 1 ml abs. Ethanol und 50 µl Natriumacetat versetzt und bei -70°C über Nacht gefällt.

Die RNA wurde durch Zentrifugation (14.000 U/min, 4°C, 30 min) pelletiert und mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen. Das Pellet wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 100 µl TMC-Puffer aufgenommen. Ein DNase-Verdau erfolgte durch die Zugabe von 5 µl DNase-Lösung und Inkubation für 30 min bei 37°C. Dieser enzymatisch behandelte Ansatz wurde mit 400 µl TN 150-Puffer versetzt und die Phenol-Extraktion in gleicher Weise wiederholt. Nach einer anschließenden gleichartigen Extraktion mit 400 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) erfolgte eine erneute Ethanol-präzipitation mit anschließender Pelletierung und Waschung mit Ethanol (70%). Das Pellet wurde nach der Trocknung in einer Vakuumzentrifuge in 50 µl TE (pH 8,0) aufgenommen, aliquotiert und bei -70°C gelagert. Ein Teil der Aliquots wurde mit DEPC-behandeltem Glyzerin (1:1) versetzt und anschließend bei -20°C gelagert. Dadurch sank der Gefrierpunkt der Lösung auf unter -20°C, so daß mögliche Schädigungen der rRNA durch Auftauen und Einfrieren vermieden wurden. Nach Optimierung der Amplifikationsbedingungen (s. Kap. 2.5.2.2) konnte die so aufgearbeitete rRNA ohne weitere Aufreinigungen (wie z.B. Reinigung über Sephadex-Säulen oder erneute PVP-Fällung) amplifiziert werden.

### 2.3.2 Extraktion von DNA aus Umweltproben

Die Extraktion und Aufreinigung von DNA wurde nach verschiedenen Protokollen durchgeführt (s. Kap. 3.1). Nachdem ein Verfahren entwickelt wurde, mit dem einerseits DNA in ausreichender Reinheit für anschließende molekularbiologische Analysen gewonnen werden konnte und das andererseits eine Vergleichbarkeit mit der extrahierten rRNA zuläßt, wurde dieses Verfahren für alle Versuchsansätze angewandt.

Standard-Protokoll für die Extraktion und Aufreinigung genomischer DNA:Parallele DNA-Extraktion (mod. nach Felske *et al.*, 1996) mit anschließender AufreinigungTN 500-Puffer

Tris-HCL (pH 8,0)	10 mM
Natriumchlorid	500 mM

Natriumacetat Lösung

Natriumacetat (pH 5,2)	3 M
Phenol (TE-Puffer gesättigt)	pH 8,0

Der Überstand der Ultrazentrifugation zur Pelletierung von Ribosomen (s. Kap. 2.3.1) wurde in ein Zentrifugenröhrchen (Polypropylen, 50 ml) überführt, mit 1/10 Vol. Natriumacetat-Lösung sowie 3 Vol. abs. Ethanol versetzt und bei -70°C über Nacht inkubiert.

Durch eine Zentrifugation (10.000 g, 30 min, 4°C) wurde die DNA präzipitiert und das Pellet in 500 µl TN-500 Puffer durch vorsichtiges Vortexen suspensiert. Die Suspension wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt, mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und mehrfach invertiert. Die durch Zentrifugation (13.000 U/min, 2 min) abgetrennte wäßrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und diese Extraktion zweimal wiederholt. Abschließend erfolgte in gleicher Weise eine Extraktion mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Die schließlich abgenommene wäßrige Phase wurde mit 1 ml abs. Ethanol versetzt, der Ansatz gemischt und bei -70°C für 30 min inkubiert. Durch eine Zentrifugation (14.000 U/min, 30 min, 4°C) wurde die DNA pelletiert und mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen. Das Pellet wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die so gewonnene DNA war in der Regel allerdings noch so stark verunreinigt, daß weitere Aufreinigungen nötig waren.

Aufgrund der hohen und gut reproduzierbaren Aufreinigungseffizienz erwies sich eine Behandlung über Wizardsäulen mit dem „Wizard DNA clean-up-System“ (Promega Corporation Madison, USA) am geeignetsten. Die Aufreinigung beruht auf dem spezifischen Bindungsvermögen der DNA an Silika-Partikel und erfolgte nach Anleitung der Herstellerfirma, wobei ein Vakuumexsugator zu Hilfe genommen wurde. Die aufgereinigte DNA wurde anschließend in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und stand nun für weitere Analysen zur Verfügung.

**2.3.3 Extraktion von DNA aus Reinkulturen**

(Pitcher *et al.*, 1989; mod. Nach S. Meier-Bethke, persönliche Mitteilung)

GES-Puffer

Guanidiniumisothiocyanat	5 M
EDTA (pH 8,0)	100 mM
N-Laurylsarcosin	0,5%

Einzelne Kolonien von auf festen Nährmedien angezogenen Reinkulturen wurden in 500 µl GES-Puffer homogenisiert. Bei Anzucht der Reinkulturen in flüssigen Nährmedien wurden 1,5 ml der Kultur zentrifugiert (14.000 U/min, 3 min), das Pellet in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und ebenfalls in Eppendorfreaktionsgefäßen mit 500 µl GES-Puffer versetzt. Nach Zugabe von 0,4 gr Glas-

perlen (Durchmesser 100 µm) erfolgte der Zellaufschluß innerhalb von 30 sec durch Schütteln im MSK-Zellhomogenisator (Braun, Melsungen) in den Eppendorfreaktionsgefäßen. Das Lysat wurde mit 250 µl Ammoniumacetat-Lösung (7,5 M) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) erfolgte eine Zentrifugation (14.000 U/min, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert (14.000 U/min, 15 min, 4°C). Das resultierende Pellet wurde 5mal mit je 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und jeweils für 20 sec zentrifugiert (9000 U/min). Anschließend wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

## 2.4. Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

### • Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentrationen aus Reinkulturen erfolgte mit einem DU 50 Spektralphotometer (Beckman, München). Geringere Mengen an Nukleinsäuren wurden mit dem Dyna-Quant 200-Fluorimeter (Hoefer, Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) gemessen.

### • Bestimmung der DNA-Konzentration über Gelelektrophorese

Geringe DNA-Konzentrationen, wie sie z.B. nach der Extraktion von DNA aus Umweltproben vorlagen, konnten photometrisch nicht gemessen werden. Eine Mengenabschätzung erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarose-Gel durch Vergleich der Fluoreszenzintensität von Gelbanden nach Anfärbung mit Ethidiumbromid im Vergleich zu einem Standard mit bekannten DNA-Konzentrationen (Molekulargewichtsmarker, MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

## 2.5 Polymerase-Kettenreaktion

### 2.5.1 Primer

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine gängige und effiziente Methode zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten. Sie hat sich in den letzten Jahren, ausgehend von der Erstbeschreibung durch Saiki *et al.* (1985) zu einer molekularbiologischen Standardmethode entwickelt.

Durch Verwendung von Primern, die an hochkonservierten Sequenzen der 16S rDNA binden, sog. „universelle“ oder „generelle“ Primer, sollte es möglich sein, bakterielle Sequenzen aus verschiedenen taxonomischen Gruppen in einer Mischprobe zu vervielfältigen. Dagegen bietet die Verwendung von „spezifischen“ Primern, die gezielt nur bei bestimmten Gruppen an definierten Bereichen der 16S rDNA binden, die Möglichkeit, selektiv einzelne bakterielle Gruppen in einer Umweltprobe zu amplifizieren und analysieren.

Jeweils einer der hier verwendeten Primer eines Paares wies am 5'-Ende eine sogenannte GC-Klammer (G- und C- reiche Sequenz aus ca. 40 Nukleotiden) auf, die während der PCR an die amplifizierte Zielsequenz angehängt wurde. Durch diese Modifikationen erhöht sich die thermische Stabilität der damit hergestellten PCR-Produkte, was ein besseres Trennverhalten in der nachfolgenden TGGE nach sich zieht (s. Kap. 2.6).

Die in dieser Arbeit eingesetzten universellen Primer F984 und R1346 wurden von B. Engelen entwickelt (Felske *et al.*, 1996; Engelen, 1998). Daneben wurden im Verlauf dieser Arbeit weitere universelle Primer mit verschiedenen GC-Klammern getestet, sowie spezifische Primer, die gezielt Nukleinsäuren von Sinorhizobien und verwandten Sequenzen amplifizieren sollten (Abb. 1). Primerentwicklung und Untersuchung auf Eignung der entstehenden DNA-Fragmente für die TGGE-Analyse werden in Kap. 3.2 detailliert behandelt.

Tab.2 Verwendete Primer und GC-Klammersequenzen (5'-3' Richtung)

GC-Klammern

GC-1 CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

(Engelen, 1998)

GC-2 GCG GCG GCT GCG GCG GCG GCG ACG GCT GCG AC

Universelle Primer

• Vorwärtsprimer

F984 AAC GCG AAG AAC CTT AC

*E. coli* Position: 968-984

F984-GC GC1-Klammer-AAC GCG AAG AAC CTT AC

(Felske *et al.*, 1996; Engelen, 1998)

F26 GAG AGT TTG ATC CTG GCT CA

*E. coli* Position: 7-26

F26-GC GC1-Klammer- GAG AGT TTG ATC CTG GCT CA

• Rückwärtsprimer

R1346 TAG CGA TTC CGA CTT CA

*E. coli* Position: 1330-1346

(Felske *et al.*, 1996; Engelen, 1998)

R519 GTA TTA CCG CGG CTG CT

*E. coli* Position: 519-535

R519-GC1 GC1-Klammer-GTA TTA CCG CGG CTG CT

R519-GC2 GC2-Klammer-GTA TTA CCG CGG CTG CT

Spezifischer Primer

R1463 GCT GAC CCT ACC GTG GTT

*E. coli* Position: 1463-1481

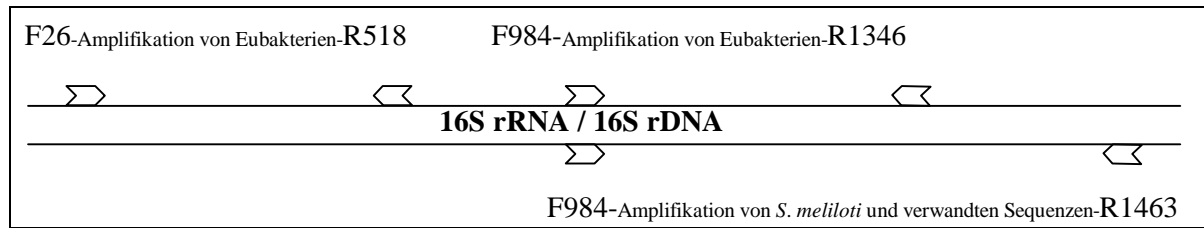


Abb. 1: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der in dieser Arbeit verwendeten Primer für TGGE-Analysen

### • Präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Überprüfung der vollständigen Synthese der GC-Klammer bei PCR-Primern

Bei der kommerziellen Synthese von relativ langen und GC-reichen Oligonukleotiden, wie die Primer mit GC-Klammern, besteht die Möglichkeit der Bildung unvollständiger GC-Klammern. Die Verkürzung der GC-Klammer kann in einer nachfolgenden TGGE-Analyse die vermehrte Bildung von einzelsträngiger DNA bedingen (Engelen, 1998). Zur Kontrolle der Qualität der neuentwickelten Primer wurden diese einer Elektrophorese in einem Acrylamid-Gel (16%) unterzogen, wobei Primer mit unvollständigen GC-Klammern mehrere Banden zeigten. Hierdurch war es möglich, nur diejenigen Primer für eine Amplifikation zu verwenden, die sich durch eine vollständige GC-Klammer auszeichneten.

#### Gellösung (50 ml)

Acrylamid	15,2%
Bisacrylamid	0,8%
Harnstoff	7 M
in 1x TBE-Puffer	

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 24 µl TEMED und 350 µl Ammoniumpersulfat-Lösung (10%) gestartet und erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die zu überprüfenden Primer (400 pmol) wurden vor dem Auftragen durch Erhitzen auf 100°C für 5 min in Formamid und Abkühlen auf Eis denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 Volt innerhalb von 16 h in 1x TBE-Puffer. Die Oligonukleotide wurden anschließend durch eine Silberfärbung (s. Kap. 2.6.2.) detektiert, wobei die Inkubationszeiten für Färbung und Entwicklung verdoppelt wurden.

## 2.5.2 Amplifikation von Nukleinsäuren

Die in der Literatur beschriebenen Protokolle zur Amplifikation von 16S rDNA- und 16S rRNA-Extrakten mit den hier benutzten Primernpaaren (Felske *et al.*, 1996, Engelen, 1998) führten bei den in dieser Arbeit untersuchten Umweltproben nicht zu einer erfolgreichen Amplifikation. Daher mußten hierfür, ebenso wie für die Amplifikation mit den neu entwickelten Primerpaaren, die Konzentrationen der einzelnen Komponenten in den RT-PCR und PCR-Reaktionen sowie die Art des Temperaturverlaufes optimiert werden. Nach Einstellung der Amplifikations-Parameter wurden diese dann für alle Versuche fest verwendet.

### 2.5.2.1 PCR zur Amplifikation von Abschnitten der 16S rDNA

Genomische DNA sowohl von Reinkulturen als auch von Umweltproben wurde unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen mit dem *AmpliTaq* DNA Polymerase-Stoffelfragment und Puffer-Kit von Perkin-Elmer (Applied Biosystems, Weiterstadt) amplifiziert. Allerdings erfolgte die Amplifikation der DNA von Reinkulturen oder Klonsequenzen nur mit 30 Zyklen.

Die Verwendung von denaturierenden Agenzien, wie DMSO, führt einerseits zu einer Minimierung von unspezifischem Primerannealing in der PCR, andererseits kann es die präferenzielle Amplifikation von Sequenzen mit unterschiedlich hohen G+C-Gehalten vermindern (Übersicht bei v. Wintzingerode *et al.*, 1997). Da in komplexen mikrobiellen Gemeinschaften der G+C-Gehalt der rDNA-Sequenzen stark variieren kann, wurde DMSO in allen PCR-Reaktionen eingesetzt. Zudem war in den Nukleinsäureextrakten aus Umweltproben der Anteil an inhibitorischen Substanzen noch relativ hoch, so daß bei allen PCR-Reaktionen von Umweltproben BSA eingesetzt wurde, da diese Substanz zu einer Verringerung der inhibitorischen Effekte von Hemmstoffen in der PCR führt (Kreader, 1996).

- Amplifikation mit den Primern F984-GC und R1346

PCR-Reaktionsansatz (50µl)		PCR-Temperaturprogramm	
Tris-HCL (pH 8,3)	10 mM	Stufe 1	5 min bei 94°C
KCl	10 mM		
MgCl <sub>2</sub>	3 mM	Stufe 2	90 sec bei 94°C
DMSO (vol/vol)	5%	(35 Zyklen)	40 sec bei 61°C
dNTP	je 100 µM		40 sec bei 70°C
Primer	je 20 pmol		
Ampli <i>Taq</i> DNA Polymerase	5U	Stufe 3	5 min bei 70°C
BSA (in Umweltproben)	0,01%		

- Amplifikation mit den Primern F984-GC und R1463

PCR-Reaktionsansatz (50µl)		PCR-Temperaturprogramm	
Tris-HCL (pH 8,3)	10 mM	Stufe 1	5 min bei 94°C
KCl	10 mM		
MgCl <sub>2</sub>	3mM	Stufe 2	90 sec bei 94°C
DMSO (vol/vol)	5%	(35 Zyklen)	40 sec bei 61°C
dNTP	je 100 µM		40 sec bei 70°C
Primer	je 15 pmol		
Ampli <i>Taq</i> DNA Polymerase	5U	Stufe 3	5 min bei 70°C
BSA (in Umweltproben)	0,01%		



- Amplifikation mit den Primern F26 und R519-GC2

<u>PCR-Reaktionsansatz (50µl)</u>		<u>PCR-Temperaturprogramm</u>	
Tris-HCL (pH 8,3)	10 mM	Stufe 1	3 min bei 94°C
KCl	10 mM		
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM	Stufe 2	40 sec bei 94°C
DMSO (vol/vol)	5%	(33 Zyklen)	40 sec bei 51°C
dNTP	je 200 µM		40 sec bei 70°C
Primer	je 20 pmol		
Ampli <i>Taq</i> DNA Polymerase	5U	Stufe 3	5 min bei 70°C
BSA (in Umweltproben)	0,01%		

- Amplifikation mit den Primern F26 und R519-GC1

<u>PCR-Reaktionsansatz (50µl)</u>		<u>PCR-Temperaturprogramm</u>	
Tris-HCL (pH 8,3)	10 mM	Stufe 1	5 min bei 94°C
KCl	10 mM		
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM	Stufe 2	90 sec bei 94°C
DMSO (vol/vol)	7,5%	(10 Zyklen)	30 sec bei 62°C
dNTP	je 200 µM		40 sec bei 70°C
Primer	je 15 pmol	Jeden 2. Zyklus	1°C tiefer bis 58°C
Ampli <i>Taq</i> DNA Polymerase	5U		
BSA (in Umweltproben)	0,01%	Stufe 3	90 sec bei 94°C
		(25 Zyklen)	30 sec bei 57°C
			40 sec bei 70°C
		Stufe 4	5 min bei 70°C

- Amplifikation mit den Primern F26-GC und R519

<u>PCR-Reaktionsansatz (50µl)</u>		<u>PCR-Temperaturprogramm</u>	
Tris-HCL (pH 8,3)	10 mM	Stufe 1	3 min bei 94°C
KCl	10 mM		
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM	Stufe 2	90 sec bei 94°C
DMSO (vol/vol)	5%	(35 Zyklen)	40 sec bei 58°C
dNTP	je 150 µM		40 sec bei 70°C
Primer	je 15 pmol		
Ampli <i>Taq</i> DNA Polymerase	5U	Stufe 3	5 min bei 70°C
BSA (in Umweltproben)	0,01%		

Der Reaktionsansatz wurde nach Zugabe der DNA-Zielsequenzen (Reinkulturen: etwa 1 ng/µl, Umweltproben: 1µl der extrahierten DNA, wobei die Extrakte aus den Habitaten der Rhizosphäre und Rhizoplane in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt wurden, s. Kap. 3.1) mit 50 µl PCR-Öl versehen und in einem Hybaid Omni-Gene Temperatur Cycler amplifiziert. Hierbei wurden die Proben

erst dann in das Gerät gestellt, nachdem die Denaturierungstemperatur der Stufe 1 erreicht war. Die Abschätzung der Konzentration und Qualität der erhaltenen PCR-Produkte erfolgte durch eine Elektrophorese in einem 1,5%-igen Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromidfärbung.

Für Analysen, bei denen geringere Amplifikatmengen benötigt wurde (z.B. bei der Analyse von Reinkulturen) wurde der PCR-Reaktionsansatz auf 25 µl halbiert. Wurden als PCR-Zielsequenzen statt genomischer DNA bakterielle Zellen eingesetzt, erfolgte der Denaturierungsschritt in Stufe 1 des Temperaturprogrammes bei 94°C für 10 min.

Die Amplifikation der Nukleinsäuren mit den Primerpaaren F984-GC/R1463 und F984-GC/R1346 erfolgte unter relativ hohen Annealingtemperaturen von 61°C, um zum einen eine genügend hohe Spezifität des Primers R1463 zu gewährleisten (s. Kap. 3.2.2). Zum anderen stellte sich heraus, daß der Primer R1346 eine zweite Bindungsstelle im Bereich der 16S rDNA besitzt. Neben der eigentlichen Bindungsstelle 1330 bis 1346 (*E. coli*-Numerierung) weist die 16S-rDNA einen weiteren konservierten Abschnitt (1489-1505, *E. coli*-Numerierung) auf, der teilweise komplementär zum Primer R1346 ist (Engelen, 1998). Diese teilweise Komplementarität, die das besonders kritische 3'-Ende des Primers betrifft, führt bei Verwendung von Annealingtemperaturen von unter 59°C zur zusätzlichen Amplifikation eines längeren Abschnittes der 16S-rDNA. Dieses Amplifikat war im Agarose-Gel zusätzlich zu der Bande mit erwarteter Länge als schwächere Nebenbande detektierbar. Durch das Heraufsetzen der Annealingtemperatur auf 61°C und die Verwendung von DMSO ließ sich allerdings die Amplifikation dieser unerwünschten längeren Sequenz vermeiden.

#### **2.5.2.2 RT-PCR zur Amplifikation von Abschnitten der 16S rRNA**

Bei der reversen Transkriptions-PCR (RT-PCT) wird der eigentlichen PCR-Reaktion ein reverser Transkriptionsschritt vorgeschaltet, durch den ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) anhand der vorliegenden RNA-Matrize erstellt wird. Sobald eine zu amplifizierende rRNA-Probe allerdings noch DNA enthält, würde diese DNA-Verunreinigung ebenfalls zu einem Amplifikat führen. Daher wurde standardmäßig eine Kontroll-PCR durchgeführt, die sicherstellt, daß das Amplifikationsprodukt auf rRNA- und nicht auf rDNA-Sequenzen zurückzuführen ist.

Zur Amplifikation bakterieller ribosomaler RNA-Sequenzen wurden im Laufe dieser Arbeit zwei verschiedene reverse Transkriptasen benutzt, deren Verwendung in Kap. 3.6.4 dargestellt wird.

Die hauptsächlich verwendete hitzestabile *rTth*-DNA Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* zeigt in Anwesenheit von Mangan-Ionen eine zusätzliche reverse Transkriptase-Aktivität (Myers & Gelfand, 1991). Die hohe Reaktionstemperatur von 70°C ermöglicht eine Lösung von Sekundärstrukturen der zu amplifizierenden rRNA und führte nach Optimierung der Reaktionsbedingungen zu hohen Amplifikationsraten. Vor allem durch Erhöhung der Polymerasekonzentration und erneute Zugabe des Rückwärtsprimers nach erfolgter reverser Transkription konnte die Produktausbeute deutlich erhöht werden.

Allerdings erwies sich dieses Enzym als relativ sensibel gegenüber Verunreinigungen in Umwelt-RNA-Proben, die zu einer Hemmung der Reaktion führten. Bei den offensichtlich stärker verunreinigten rRNA-Proben, die zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit zur Untersuchung der natürlichen Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft von Luzerne analysiert werden sollten (Kap. 3.6.4),

mußte aus diesem Grund eine weniger Hemmstoff-sensible reverse Transkriptase verwendet werden. Hierbei zeigte die M-MLV-reverse Transkriptase aus dem *Moloney Murine Leukemia Virus* gute Amplifikationsraten.

Nach Optimierung der RT-PCR-Protokolle der jeweiligen Enzyme erfolgte die Amplifikation ribosomaler RNA-Sequenzen der jeweiligen Proben in gleicher Weise.

- Standardamplifikation mit der *rTth* DNA Polymerase (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt)

#### RT-Reaktionsansatz für den reversen Transkriptionsschritt (10µl)

Tris-HCl (pH 8,3)	10 mM
KCl	90 mM
MnCl <sub>2</sub>	1 mM
DMSO (vol/vol)	5%
dNTP	je 250 µM
Rückwärtsprimer	7,6 pmol
<i>rTth</i> DNA polymerase	2,5 U

#### PCR-Additiv zur Amplifikation der cDNA (40µl)

Tris-HCl (pH 8,3)	10 mM
KCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
EGTA	0,75 mM
Glyzerin (vol/vol)	5%
Tween 20 (Vol/vol)	0,05 %
dNTP	je 50 µM
Vorwärtsprimer	7,6 pmol
Rückwärtsprimer	2,6 pmol
Ampli <i>Taq</i> DNA Polymerase	10 U
(Stoffelfragment, Perkin Elmer)	

#### PCR-Temperaturprogramm

Stufe 1	1 min bei 94°C
Stufe 2	15 sec bei 94°C
(35 Zyklen)	20 sec bei 56°C
	40 sec bei 68°C
Stufe 3	5 min bei 70°C

Nach Zugabe der Template-RNA in den RT-Reaktionsansatz (1µl der extrahierten und in TE/Glyzerin aufgenommen rRNA aus Umweltproben, wobei die rRNA-Extrakte aus den Habitaten Rhizosphäre und Boden in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt wurden, s. Kap. 3.1) wurde der Reaktionsansatz mit 50 µl PCR-Öl überschichtet. Die reverse Transkription erfolgte während einer Inkubation von 15 min bei 70°C im Thermocycler. Die so gebildete cDNA wurde anschließend amplifiziert, indem diesem Reaktionsansatz 40 µl der PCR-Additiv-Lösung zugesetzt wurde und der Reaktionsansatz mit dem entsprechenden Temperaturprogramm inkubiert wurde. Die Amplifikation der cDNA von Reinkulturen erfolgte nur mit 30 Zyklen.

Da bedingt durch den reversen Transkriptionsschritt bei 70°C die zu amplifizierende cDNA die zweite mögliche Bindungsstelle für den Primer F1346 (s. Kap. 2.5.2.1) nicht mehr aufwies, konnte zur Steigerung der Produktausbeute die Annealingtemperatur auf 56°C herabgesetzt werden.

- Amplifikation mit der M-MLV-reversen Transkriptase, RNase H<sup>-</sup> (Promega, Madison, USA)

#### RT-Reaktionsansatz für den reversen Transkriptionsschritt:

<u>Lösung a (7,5 µl)</u>		<u>Lösung b (12,5µl)</u>	
Rückwärtsprimer	20 pmol	Tris-HCl (pH 8,3)	50 mM
Template	1 µl	KCl	75 mM
		MgCl <sub>2</sub>	3 mM
		DTT	10 mM
		dNTP	250 µM
		MMLV reverse Transkriptase	100 U

Die RNA-Extrakte und der Rückwärtsprimer (Lösung a) wurden nach Zugabe von 25 µl PCR-Öl durch Inkubation von 5 min bei 70°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit 12,5 µl der Lösung b versetzt. Die reverse Transcription erfolgte während einer Inkubation von 1 h bei 42°C in einem Thermocycler. Anschließend wurden 2 µl dieses Ansatzes in eine PCR-Reaktion, wie in Kap. 2.5.2.1. beschrieben, eingesetzt und dadurch die cDNA amplifiziert.

#### • **Kontroll-PCR**

Um sicherzustellen, daß das erhaltene Amplifikationsprodukt auf rRNA-Sequenzen zurückzuführen ist, wurde parallel zu den beschriebenen RT-PCR Reaktionen von dem Nukleinsäureextrakt eine PCR mit einer herkömmlichen DNA-Polymerase (Stoffel-Fragment, Ampli Taq-DNA-Polymerase) durchgeführt, die bei DNA-freien Ansätzen kein Amplifikationsprodukt liefern durfte.

Durch die Optimierung des DNase-Verdau (s. Kap. 2.3.1) konnten keine DNA-Verunreinigungen in den rRNA-Proben detektiert werden, so daß ein anschließender erneuter DNase-Verdau bei den zu analysierenden Umweltproben nicht mehr nötig war.

## **2.6 Temperatur Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE)**

PCR Produkte gleicher Länge, wie sie bei der Amplifikation von 16S rDNA oder rRNA Sequenzen entstehen, können nach ihrer Sequenz in denaturierenden Gradientengelen aufgetrennt werden (Lerman *et al.*, 1984; Myers *et al.*, 1985). Die sequenzabhängige Auftrennung ist dadurch begründet, daß ein Aufschmelzen der DNA-Doppelhelix durch den Bruch von Wasserstoffbrücken stattfindet, wenn DNA-Doppelstränge denaturierenden Bedingungen ausgesetzt werden. Da A-T-Bindungen eine geringere Stabilität als G-C-Bindungen besitzen, kommt es zur Ausprägung sogenannter Schmelzdomänen in A-T-reichen Regionen des Moleküls. Realisiert wird dieses Prinzip in Gelsystemen mit linear steigenden, denaturierenden Gradienten. Im Gegensatz zur DGGE (Gradient denaturierender Chemikalien im Gel, konstante Temperatur) wird während der TGGE ein Polyacrylamidgel homogener Zusammensetzung mit einem linearen Temperaturgradienten überlagert (Rosenbaum & Riesner, 1987).

Um den Temperaturbereich mit der optimalen Trennleistung zu ermitteln, wird ein relativ großer

Temperaturgradient (i.d.R. 20°C-65°C) senkrecht zur Elektrophoreserichtung angelegt („senkrechter Gradient“), so daß DNA mit einheitlicher Sequenz nach der Elektrophorese im gefärbten Gel als sigmoide Kurve erscheint. Dieser Verlauf ergibt sich dadurch, daß ab einer bestimmten Temperatur die Doppelhelix teilweise aufschmilzt und so der Reibungswiderstand in der Gelmatrix deutlich zunimmt. Vollständig aufgeschmolzene DNA-Stränge (Einzelstränge) zeigen eine höhere Migrationsrate, wobei ein vollständiges Aufschmelzen während der Elektrophorese allerdings behindert werden kann, wenn die zu analysierenden DNA-Moleküle an einem Ende um eine G+C reiche Sequenz (GC-Klammer) erweitert werden. Daneben kann die Verwendung einer GC-Klammer zur Detektion von annähernd 100% aller Sequenzunterschiede zwischen DNA-Molekülen gleicher Länge führen (Lerman *et al.*, 1984; Sheffield *et al.*, 1989).

In Abb. 4 (Kap. 3.2.1) sind beispielhaft Schmelzkurven dargestellt. Das starke Abknicken der Denaturierungskurve markiert die charakteristische Schmelztemperatur der jeweiligen untersuchten DNA und kann so zur Ermittlung des optimalen Trenntemperaturbereiches herangezogen werden. Dieser Temperaturgradient wird anschließend in der standardmäßig durchgeführten, sogenannten „parallelen Gradienten-Gelelektrophorese“ eingesetzt, um Gemische verschiedener DNA-Sequenzen aufzutrennen. Hierbei wird der Temperaturgradient parallel zur Elektrophoreserichtung angelegt, so daß die DNA-Moleküle in Richtung steigender Temperatur wandern. Bei einer bestimmten Temperatur nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der jeweiligen Moleküle durch ihre Konformationsänderung so stark ab, daß sie als Banden im Gel fokussiert werden und so sequenzverschiedene Moleküle voneinander getrennt werden können (Lerman *et al.*, 1984).

### 2.6.1 Gelpräparation und Elektrophorese

<u>Elektrophoresepuffer (1x)</u>		<u>Auftragspuffer (5x)</u>	
MOPS	20 mM	MOPS	200 mM
EDTA	1 mM	EDTA	10 mM
pH 8,0		Bromphenolblau	0,05%
		Xylencyanol	0,05 %
		pH 8,0	

<u>Gellösung (45 ml)</u>	
Acrylamid	6%
Bisacrylamid	0,1%
Harnstoff	8 M
Formamid	20%
Glyzerin	2%
in 1x MOPS-Elektrophoresepuffer	

Formamid wurde vor Gebrauch mit jeweils 2 gr pro 100 ml Ionenaustauscher (Serdolit MB-1, Serva, Heidelberg) solange behandelt, bis die Leitfähigkeit weniger als 20 mS betrug.

Die Gele wurden 1 mm dick auf die hydrophile Seite einer Gelbond-Folie (Biozym, Hess. Oldendorf) gegossen. War allerdings für weitergehende Analysen die Ablösung der Folie nach der Elektro-

phorese erforderlich (s. Kap. 2.6.2), wurde die Gellösung auf die hydrophobe Seite der Folie gegossen. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 77 µl TEMED und 200 µl Ammoniumpersulfat-Lösung (10%) gestartet und erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Die Elektrophorese erfolgte in einer TGGE-Apparatur von Diagen (Düsseldorf) mit 1x MOPS-Puffer. Nach einem Vorlauf (20 min, 300 Volt) mit eingestelltem Temperaturgradienten wurden 5 µl der zu analysierenden PCR-Produkte mit 1 µl Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte innerhalb von 5 h bei 28 mA. Dabei wurden nach entsprechender Optimierung des Temperaturgradientens für die jeweiligen PCR-Produkte folgende Temperaturbereiche angelegt:

PCR-Produkte amplifiziert mit den Primern	eingestellter Temperaturgradient
F984-GC/R1346	35°C – 50°C
F984-GC/R1463	35°C – 50°C
F26-GC/R519	37°C – 52°C

## 2.6.2 Färbung von TGGE-Gelen

In der Regel wurden die foliengestützten Gele mit Silbernitrat angefärbt, da diese Methode sensitiver ist als eine SYBR-Green- oder Ethidiumbromidfärbung. Außerdem lassen sich die Gele dauerhaft färben, trocknen und aufbewahren. Da allerdings Silberfärbungen von Nukleinsäuren weiterführende Analysen, wie z.B. Bandenelution oder Blotten von Gelen einschränken, wurden für solche Analysen die Gele mit SYBR-Green angefärbt.

### • Silberfärbung von TGGE-Gelen

Nach empirischer Austestung verschiedener Silberfärbemethoden, die eine unterschiedliche Sensibilität bezüglich des Färbens von Nukleinsäuren und des Gelhintergrundes aufwiesen, wurde das nachfolgend beschriebene Verfahren als Standardprotokoll durchgeführt. Obwohl hierbei der Gelhintergrund deutlich angefärbt wurde, zeigte diese Methodik die höchste Empfindlichkeit auch gegenüber geringen Nukleinsäurekonzentrationen im Gel, wie sie häufig bei der Analyse von Umweltproben auftreten.

Durchführung (nach Sanguinetti *et al.*, 1994, modifiziert)

#### Fixier-Lösung

Ethanol (abs.)	10%
Essigsäure	0,5%

#### Färbe-Lösung

AgNO <sub>3</sub>	0,2 %
in Fixier-Lösung	

#### Entwickler-Lösung

Formaldehyd	0,1 %
in 3 % NaOH-Lösung	

#### Konservierungslösung

Glyzerin (85%)	10 %
Ethanol	25 %

Die Gele wurden nacheinander in den verschiedenen Lösungen (je 300 ml) geschwenkt:

1. Fixierung für 3 min in Fixier-Lösung
2. Färbung für 15 min in Färbe-Lösung
3. Spülen des Gels mit destilliertem Wasser für 2 min, Wechseln der Färbeschale
4. Behandlung für 15 min in Entwickler-Lösung
5. Fixierung für 5 min in Fixier-Lösung
6. Waschen des Gels mit destilliertem Wasser für 5 min
7. Konservierung des Gels in Konservierungslösung für 7 min
8. Bedeckung des Gels mit in Konservierungslösung gequollener Zellophanfolie
9. Trocknung des in Trocknungsrahmen eingespannten Gels bei 80°C für 3 h

- **SYBR-Green Färbung von TGGE-Gelen**

SYBR-Green-Lösung (FMC Bioproducts, Vallensbaek Strand, Dänemark)

SYBR-Green I            25 µl

in 50 ml 0,5 x TBE-Puffer

Die Polymerisation des Geles erfolgte auf der hydrophoben Seite der Trägerfolie, so daß die Folie nach der Elektrophorese durch vorsichtiges Schwenken des Gels in destilliertem Wasser abgelöst werden konnte. Nach 45 min Inkubation in 50 ml Färbelösung im Dunkeln konnten die Nukleinsäuren auf einem mit einem Gelbfilter versehenen UV-Tisch detektiert werden.

### 2.6.3 Elution von Banden aus TGGE-Gelen

Da eine Extraktion von Nukleinsäuren aus silbergefärbten TGGE-Gelen nicht möglich war, wurden mehrere in der Literatur beschriebene Methoden (Sambrook *et al.*, 1989; Sanguinetti *et al.*, 1994; Øvreås *et al.*, 1997; Engelen *et al.*, 1998; Heuer *et al.*, 1999) getestet und modifiziert, um PCR-Produkte aus SYBR-Green gefärbten Gelen zu eluieren. Dabei zeigte sich, daß eine nachfolgende Amplifikation der Eluate nur dann erfolgreich war, wenn sehr kräftige Banden aus den Gelen eluiert wurden. Schwächere Banden waren in der Regel nicht amplifizierbar, und auch bei Erzielung eines Amplifikates zeigte dieses nach einer erneuten TGGE-Analyse fast immer mehrere starke Banden zusätzlich zu der gewünschten Bande.

Am geeignetsten erschien die Elutionsmethode, bei der die aus dem Gel ausgeschnittene Bande in 25 µl destilliertem Wasser aufgenommen wurde, 10 min bei 94°C erhitzt wurde und 6-8 µl dieses Eluates als Template in eine nachfolgende PCR eingesetzt wurde. Stärkere Banden in einem Bandenmuster waren hierdurch nach einer Elution fast immer amplifizierbar, wobei nach einer erneuten Elektrophorese nur selten weitere Banden auftraten.

Im späteren Verlauf der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit A. Zock eine Methode weiterentwickelt, die es ermöglichte, auch feine Banden aus einem Bandenmuster erfolgreich zu eluieren und amplifizieren. Eine nachfolgende Trennung der Amplifikate auf der TGGE zeigte, daß neben der gewünschten Bande nur sehr wenige, feine weitere Banden auftraten. Diese Methodik beruht darauf, daß durch die Benutzung von BAC (N-N'-bis(Acryloyl)-Cystamin) anstelle von Bisacrylamid eine andersartige Quervernetzung in dem Polyacrylamidgel erfolgt. Die hierbei gebildeten Cystamin-

bindungen (Disulfidbrücken) können mit 2-Mercaptoethanol zerstört werden, so daß das polymerisierte Gel wieder aufgelöst und die darin enthaltenen Nukleinsäuren eluiert werden können.

#### Bandenelution aus BAC-TGGE Gelen (Muyzer *et al.*, 1998, modifiziert)

Da BAC eine höhere Molmasse als Bisacrylamid besitzt, enthielten die entsprechenden BAC-TGGE-Gellösungen 0,17% BAC anstelle von 0,1% Bisacrylamid, um denselben Vernetzungsgrad zu erzielen. Nach erfolgter Elektrophorese unter unveränderten Bedingungen wurde das Gel von der Trägerfolie abgelöst und mit SYBR-Green gefärbt. Die mittels steriler Skalpelle eluierten Banden wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen in 50 µl TE-Puffer gewaschen und anschließend in 100 µl 2-Mercaptoethanol für 70 min bei 37°C inkubiert. Die Präzipitation der eluierten Nukleinsäuren erfolgte nach Zugabe von 100 µl destilliertem, sterilem Wasser; 20 µl 5M NaCl-Lösung und 550 µl Ethanol (abs.) bei -70°C über Nacht. Das durch eine Zentrifugation (10.000 U/min, 4°C, 30 min) erhaltene Pellet wurde mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10.000 U/min, 4°C, 20 min). Anschließend wurde das Pellet luftgetrocknet und in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

Um den Erfolg der Elution festzustellen, wurde das Eluat in verschiedenen Verdünnungen in einer PCR mit BSA (s. Kap. 2.5.2.1) amplifiziert. Das Amplifikationsprodukt, welches aus der höchsten Verdünnungsstufe resultierte, bei der gerade noch ein Produkt erhalten werden konnte, wurde erneut auf die TGGE aufgetragen. Hierdurch sollte es möglich sein, nur die Sequenzen, die am stärksten zur Ausprägung der eluierten Bande beitrugen, zu amplifizieren (Jensen *et al.*, 1998).

Konnte sichergestellt werden, daß die ausgeschnittene Bande reamplifizierbar war und keine bzw. nur sehr wenige weitere Sequenzen amplifiziert wurden, konnte das Eluat für eine anschließende Sequenzierung in eine Klonierungs-PCR eingesetzt werden.

## **2.6.4 Klonierung und Sequenzierung eluierter TGGE-Banden**

### **• Klonierung**

Aufgrund der in Kap. 2.6.3 beschriebenen Tatsache, daß bei der Elution von Banden aus TGGE-Gelen häufig noch weitere Sequenzen mit eluiert und anschließend amplifiziert wurden, war es notwendig, alle Eluate zunächst zu klonieren und die Klonsequenzen anhand ihres Laufverhaltens auf der TGGE zu screenen. Nachdem die Klone hinsichtlich ihres Inserts ausgewählt wurden, konnten so ausschließlich die gewünschten Sequenzen einer Sequenzierung zugänglich gemacht werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsvektoren (pGEM-T vector systems, Promega) enthielten überhängende Thymidin-Reste an den Vektorsträngen, so daß PCR-Produkte mit überhängenden Adenosin-Resten ligiert werden konnten. Obwohl die hier verwendete *Taq*-DNA-Polymerase (Stoffel-Fragment) während der PCR schon einen bestimmten Anteil von Produkten erzeugte, die an den 3'-Enden einzelne überstehende Adenosin-Reste aufwiesen, war die Klonierungseffizienz nicht zufriedenstellend. Sie konnte allerdings durch Erhöhung des 3'-A-Überhanges deutlich gesteigert werden (Li & Guy, 1996). Hierzu wurde im Anschluß an die Amplifikation der eluierten Bande das PCR-Produkt mit frischen dATP (2 mM) und 2 U *Ampli-Taq*-DNA-Polymerase (Stoffelfragment) versetzt und 2 h bei 70°C inkubiert. Für diese Amplifikationen wurde das entsprechende Eluat jeweils in der Verdünnungsstufe eingesetzt, die gerade noch eine



Amplifikation ermöglichte (s. Kap. 2.6.3).

Um überschüssige Polymerasen, Primer und Nukleotide abzutrennen, wurden die PCR-Produkte mit dem „Quiaquick PCR Purification Kit“ (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, in 30 µl destilliertem Wasser aufgenommen und die Nukleinsäurekonzentration mittels einer Agarosegelelektrophorese abgeschätzt. Anschließend erfolgte die Ligation der PCR-Produkte sowie der entsprechenden Kontrollen in den pGEM-T Vektor nach Angaben des Herstellers, wobei ein molares Verhältnis des PCR-Produktes zum Vektor von 3:1 angestrebt wurde.

Nach erfolgter Transformation in *E. coli*- JM 109 Zellen (Promega) wurden die Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin/IPTG/X-Gal (s. unten) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Über eine „Blau-Weiß-Selektion“ der Klone wurden die inserttragenden Zellen erfaßt und in LB-Flüssigmedium mit Ampicillin (100 µg/ml) bei 37°C über Nacht inkubiert.

<u>LB-Medium</u>			<u>LB/amp/IPTG/X-Gal-Medium</u>	
Pepton	10	g/l	Ampicillin	100 mg/l
Hefeextrakt	5	g/l	IPTG	120 mg/l
NaCl	5	g/l	X-Gal	80 mg/l
NaOH (1N)	1	ml/l	in sterilem LB-Medium	
pH	7,0			

Zur Herstellung von Agarplatten wurde jeweils 15 gr/l Agar zugesetzt.

#### • Klonscreening auf der TGGE

Um die Klone mit den gewünschten Sequenzen auf der TGGE auszuwählen, wurden zunächst die Inserts mit den entsprechenden Primerpaaren amplifiziert. Stammten die eluierten und klonierten Banden ursprünglich aus PCR-Produkten, die mit dem spezifischen Primer R1463 amplifiziert wurden, so konnte für die nachfolgende PCR mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 direkt ein Aliquot der Übernachtskultur der gepickten Klone eingesetzt werden, da hierbei keine *E. coli*-Sequenzen erfaßt wurden. Stammten die eluierten Banden jedoch ursprünglich aus PCR-Produkten, die mit universellen Primern (R1346) amplifiziert wurden, dann führte eine PCR der Übernachtskultur der gepickten Klone mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 zu einer sehr starken Amplifikation der 16S-rDNA Partialsequenz von *E. coli*-Zellen. Da dieses die Auswahl der gewünschten Inserts auf der TGGE erschwerte, wurden zuvor die Plasmide aus den Klonen extrahiert und diese dann in die PCR eingesetzt. Die Plasmidpräparation erfolgte von 3 ml einer Übernachtskultur der Klone nach einem Protokoll von Birnboim in Ausubel *et al.* (1999).

Durch den Vergleich des Laufverhaltens dieser Amplifikate auf der TGGE gegenüber dem Bandenmuster, aus dem die Banden eluiert wurden, konnten die gewünschten Sequenzen ermittelt werden und die entsprechenden Klone für eine Sequenzierung vorbereitet werden. Hierzu wurden von den Klonen neue Vorkulturen angelegt, die entsprechenden Plasmide anschließend mittels des „Quiagen Plasmid Mini-Kits“ (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers extrahiert und in 25 µl destilliertem Wasser aufgenommen. Die Mengenabschätzung der Extrakte erfolgte durch eine Agarosegelelektrophorese im Anschluß an einem Plasmidverdau mit dem Enzym *Pst*-I nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

- **Sequenzierung**

Die in dieser Arbeit angewandte Methodik beruht auf der enzymatischen Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977), wobei nukleotidspezifische Kettenabbrüche der DNA-Polymerase-Reaktion durch Einbau von Didesoxynukleotiden detektiert werden.

Die als „Cycle-Sequenzierung“ bezeichnete Sequenzierreaktion wurde mittels des „Thermo-Sequense Kit“ (Amershan, Braunschweig) durchgeführt, wobei für eine Reaktion jeweils 300 fmol DNA eingesetzt wurde. Für die hauptsächlich erfolgten eindirektionalen Sequenzierungen wurde der Primer M13-R benutzt. Da bei der Auswertung einiger Sequenzen Unsicherheiten auftraten, wurde von diesen Sequenzen auch der Gegenstrang sequenziert, wobei der Primer M13-F benutzt wurde. Beide Primer binden an der multiplen Klonierungs-Region der Plasmide (-24r und -20f) und waren mit einem Fluoreszenzfarbstoff (IRD-800; MWG-Biotech, Ebersberg) markiert. Die Sequenzierreaktion wurde bei einer Annealingtemperatur von 56°C bei Verwendung des Primers M13-F und bei 57°C für M13-R durchgeführt.

Die Reaktionsprodukte wurden mit dem automatischen DNA-Sequenzierer LICOR-4000 (MWG-Biotech) aufgetrennt und mit der dazugehörigen Software analysiert. Die Auftrennung erfolgte anhand von 66 cm langen Gelen mit 4,3% Acrylamid („Rapid Gel XL“, Amershan), wobei eine durchschnittliche Leselänge von 800 Bp erreicht wurde.

Teilweise erfolgte die Sequenzierung auch über die Firma ITT-GmbH Bielefeld mit den Standardprimern SP6 und T7.

- **Sequenzanalyse**

Die Erstellung von Konsensussequenzen, das Alignment und die Kalkulation von Sequenzähnlichkeiten zu den nächst verwandten Sequenzen erfolgte mit dem *arb*-Programmpaket (Strunk *et al.*, 1997) anhand der Datenbank „6pubmrz97“, die durch Einträge von 16S rDNA Sequenzen aus der „Gen-Bank“ Datenbank ergänzt und aktualisiert wurde. Bei der Berechnung der Ähnlichkeitsmatrix wurde die Korrektur von Jukes-Cantor verwendet. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen sind im Anhang (Kap. 7) aufgeführt.

## **2.7 Clusteranalyse der TGGE-Profile**

Zur Auswertung der auf der TGGE erzeugten Bandenmuster wurden die silbergefärbten Gele mittels eines Flachbett-Scanners mit Durchlichteinrichtung digitalisiert. Die Quantifizierung der Banden und der Vergleich der einzelnen Spuren erfolgte mit Hilfe des Bildauswertungsprogrammes „Diversity-Database“ (MWG Biotech, Version 1.0).

Um Muster auf verschiedenen Gelen vergleichen zu können, wurden Marker-Proben als Standards verwendet, die auf jedem TGGE-Gel zusätzlich zu den Proben aufgetragen wurden. Bei den Marker-Proben handelte es sich um ein Gemisch amplifizierter 16S-rDNA Sequenzen aus Reinkulturen verschiedener taxonomischer Gruppen.

Nach Etablierung der Parameter zur Bildauswertung (s. Kap. 3.3) wurden diese für den Vergleich aller TGGE-Gele beibehalten.

Scan-Parameter der Diversity-Database Software:

Farbbereich: grün/rot

Auflösung (Pixelgröße): maximal (x: 42; y: 42)

OD zur Peakerkennung: maximal (0,0-3,0)

In Voruntersuchungen stellte sich heraus, daß Scans im Farbbereich grün die höchste Empfindlichkeit aufwiesen. Da allerdings häufig die nach einer Silberfärbung rot gefärbte Einzelstrang-DNA (ss-DNA) das eigentliche Muster teilweise überlagerte, wurde der Farbbereich grün/rot gewählt, da hierdurch die Intensität der rötlichen Einzelstrang-DNA abgeschwächt werden konnte, ohne die Detektion der schwarz gefärbten Doppelstrang-DNA zu beeinträchtigen.

Auswertungs-Parameter der Diversity-Database Software:

Hintergrundabzug über das gesamte Gel: „background stripe“-Modus  
Kontrast: „auto“-Modus

Hintergrundabzug innerhalb einer Gelspur: „Bkg Subtracted“-Modus  
Berechnung: „Rolling Disk“ Modus,  
Scheibengröße: 50

Bandendetektion:

Sensitivität: 40

Bandenbreite: 1,990 mm

Minimale OD-Werte: 0 (höchste Empfindlichkeit)

Hintergrundfilter: 2

Schultersensitivität: 1

Clusteranalyse:

Berechnung der Ähnlichkeit: Dice-Koeffizient unter Berücksichtigung der  
Bandenintensität

Clustermethode: UPGMA (unweighted pair group method using  
arithmetic averages)

Durch die gewählten Parameter zur Bandendetektion, vor allem durch die gewählten Einstellungen der „Sensitivität“ und der „Bandenbreite“, wurde eine gute automatische Bandendetektion ermöglicht. Nur wenige Banden eines Musters mußten nachfolgend per Hand erfaßt werden. Veränderte Einstellungen der Parameter „Hintergrundfilter“ und „Schultersensitivität“ hatten nur geringe Auswirkungen auf die Empfindlichkeit der automatischen Detektion von TGGE-Banden.

## 2.8 V6-Sonden

Um 16S rDNA-Sequenzen von Klonen oder Reinkulturen zu einzelnen Banden eines TGGE-Musters zuzuordnen, wurden Sonden verwendet, die mit der hypervariablen V6-Region der 16S rDNA hybridisieren (V6-Sonden; Heuer *et al.*, 1999). Die V6-Region (*E. coli*-Position 984-1047) ist Teil der TGGE-Fragmente 968-1346 und 968-1463, die aus der Amplifikation mit den Primerpaaren 984-GC/R1346 bzw. 984-GC/R1463 resultieren. Hierdurch ist es möglich, Sonden von eluierten TGGE-Banden herzustellen und diese für eine Hybridisierung mit 16S-Sequenzen von Reinkulturen oder Klonen zu nutzen. Andererseits können aber auch von Reinkultur- oder Klonsequenzen V6-Sonden hergestellt werden, um sie für eine Hybridisierung von geblotteten TGGE-Bandenmustern einzusetzen.

Die Herstellung dieser Digoxigenin-markierten V6-Sonden erfolgt durch eine Amplifikation mit universellen Primern, die an die konservierten Regionen binden, welche an die V6-Region der 16S rDNA angrenzen. Um die Spezifität der Sonden zu steigern, können nach der Amplifikation die konservierten Primersequenzen des Amplifikates enzymatisch entfernt werden. Der spezifische Abbau der Primersequenzen wird durch die Benutzung von Primern ermöglicht, die eine Phosphothionatbindung am 3'-Ende aufweisen (Heuer *et al.*, 1999). Die Reaktionsbedingungen, unter denen ein vollständiger Abbau der Primersequenzen erfolgte, wurden zuvor empirisch ermittelt und jeweils durch eine Polyacrylamid-Elektrophorese überprüft.

Die hierdurch erreichte Spezifität der modifizierten V6-Sonde wird in Kap. 3.4 dargestellt.

### 2.8.1 Sondenherstellung

Die Herstellung der Sonden kann durch Amplifikation der V6-Region der 16S rDNA von Isolaten, Klonsequenzen oder aus TGGE-Gelen extrahierten Banden erfolgen. Zur Sondenmarkierung wurde die PCR mit Digoxigenin-markierten dNTPs unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

#### Primer zur Amplifikation der V6-Region:

F 985 PTO	AAC GCG AAG AAC CTT AC <sup>S</sup> C ( <i>E. coli</i> Position 968-985)
R1062 PTO	ACA GCC ATG CAG CAC C <sup>S</sup> T ( <i>E. coli</i> Position 1046-1062)

Sonden, deren konservierte Primersequenzen nachträglich abgedaut wurden, wurden mit Primern hergestellt, die an der mit „S” markierten Position eine Phosphothionatbindung aufwiesen.

<u>PCR-Reaktionsansatz (25 µl)</u>		<u>PCR-Temperaturprogramm</u>	
Tris-HCL (pH 8,3)	10 mM	Stufe 1	5 min bei 94°C
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM		
DIG markierte NTP	5µl	Stufe 2	30 sec bei 94°C
(DIG DNA Labeling Mix, Boehringer Mannheim)		(35 Zyklen)	30 sec bei 50°C
			30 sec bei 72°C
Primer	je 10 pmol		
Ampli <i>Taq</i> DNA Polymerase	5 U	Stufe 3	1 min bei 72°C

Die PCR-Produkte wurden mit dem „QUIAEX II-Gelextraction-Kit“ (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 40 µl destilliertem Wasser aufgenommen, um Enzyme, überschüssige Primer, dNTPs und Salze zu entfernen. Anschließend erfolgte der Abbau der Primer-nukleotide bis zu den Phosphothionatbindungen durch Zugabe von 1 µl „T7 Gene 6 Exonuklease“ und 7 µl des entsprechenden Puffers (USB, Cleveland, Ohio) während einer Inkubation für 15 min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation von 10 min bei 80°C abgestoppt und anschließend erneut mit dem „QUIAEX II-Kit“ aufgereinigt. Die verbleibenden überhängenden Einzelstränge der Amplifikate wurden durch Zugabe von je 35 U Mung Bean Nuklease und 4 µl des entsprechenden Puffers (Amersham Int., Little Chalfont, England) entfernt. Die Reaktion wurde nach einer Inkubation von 15 min bei 30°C durch Zugabe von 2 µl EDTA (0,5 M pH 8,0) abgestoppt.

Die Größenreduktion dieser so modifizierten Sonden wurde durch eine Elektrophorese in einem 15% Polyacrylamidgel (250 V, 4,5 h) im Vergleich zu einer nicht modifizierten V6-Sonde überprüft. Da eine SYBR-Green Färbung der Nukleinsäuren in der Regel nicht sensitiv genug war, wurden die entsprechenden Polyacrylamidgele geblottet, ohne jedoch die DNA anschließend mit NaOH-Lösung auf der Membran zu fixieren (s. Kap. 2.8.2), da dieses die Sondenmarkierung beeinträchtigt hätte. Der Nachweis der DIG-markierten Sonden erfolgte anhand des „DIG Luminescent Detection Kit“ (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers (Kap. 2.8.3).

Erfolgreich modifizierte Sonden wurden bei -20°C gelagert und konnten für nachfolgende Hybridisierungsexperimente mehrfach eingesetzt werden.

## 2.8.2 Blotten

Zur Herstellung von Elektroblobs von SYBR-Green gefärbten TGGE-Gelen wurden die Gele 10 min in 0,5x TBE-Puffer äquilibriert. Die Nukleinsäuren wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham) mit dem „Trans-Blot SD transfer cell“-Blotter nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad, München) in 0,5xTBE-Puffer bei 400 mA (1 h) transferiert und die Membran anschließend kurz in 0,5xTBE-Puffer gewaschen. Die Denaturierung und Fixierung der DNA erfolgte durch eine zehnminütige Inkubation der Membran auf einem mit 0,4N NaOH-Lösung-gesättigten Stapel Filterpapier. Die Membran wurde anschließend für 10 min in 2xSSC-Lösung (Ausubel *et al.*, 1999) gewaschen und bei 80°C 1 h getrocknet.

Um PCR-Produkte von Klonsequenzen zu blotten, wurden die Amplifikate mit TE-Puffer auf die gleiche Konzentration verdünnt, 10 min aufgekocht und im Eisbad abgekühlt. Auf eine ungeladene

Hybond-N Nylonmembran wurden 50 µl der Amplifikate mittels einer Dot-Blot Apparatur überführt. Hierzu wurde die Membran für jeweils 2 min in Milli-Q-Wasser und in 2x SSC-Lösung gewaschen und die DNA anschließend über eine Vakuumpumpe innerhalb von 15 min auf die Membran transferiert. Die Membran wurde nacheinander auf Filterpapieren für jeweils 10 min inkubiert, die mit den nachfolgend aufgeführten Lösungen getränkt waren:

- 1.) Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl)
- 2.) Neutralisierungspuffer (1 M Tris-HCl; 1,5 M NaCl pH 7,5)
- 3.) 2x SSC-Lösung

Die Membran wurde 30 min luftgetrocknet und anschließend 2 h bei 80°C getrocknet.

### 2.8.3 Hybridisierung und Nachweis von DIG-markierten V6-Sonden

Um eine hohe Spezifität der Sonden zu erreichen, wurde die Hybridisierung unter hochstringenten Bedingungen in Anlehnung an Fulthorpe *et al.* (1995) durchgeführt. Der Nachweis der Sonden erfolgte anhand des Protokolls des „DIG Luminescent Detection Kit“ (Boehringer Mannheim), wobei als Chemilumineszenzsubstrat CSPD<sup>TM</sup> (Serva, Heidelberg) benutzt wurde.

#### Hybridisierungslösung für hochstringente Hybridisierung

(Die Angaben beziehen sich auf eine Membran von 100 cm<sup>2</sup>)

Blocking-Reagenz	5%
N-Laurylsarkosylat (vol/vol)	0,1%
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,02%
Formamid (vol/vol)	50%

in 5x SSC-Lösung

Die Zugabe von Formamid erfolgte erst nach dem vollständigen Lösen der Reagenz in einem Wasserbad bei 30°C.

25 µl der Sondenlösung wurden in 25 ml Hybridisierungslösung für 10 min bei 100°C denaturiert und im Eisbad abgekühlt. Die Vorhybridisierung der Membran erfolgte in 20 ml Hybridisierungslösung für 4 h bei 62°C, anschließend wurde die Lösung verworfen und durch die denaturierten Sonden in Hybridisierungslösung ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 62°C über Nacht. Um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen, wurden mehrere Strigenzwaschungen durchgeführt: Zweimaliges niederstringentes Waschen erfolgte jeweils durch Inkubation der Membran für 5 min bei Raumtemperatur in 50 ml Waschlösung I (0,1% SDS in 2x SSC-Lösung), während das zweimalige hochstringente Waschen bei 68°C für jeweils 15 min in 50 ml vorgewärmter Waschlösung II (0,1% SDS in 0,1x SSC-Lösung) erfolgte. Die anschließende Detektion der DIG-Markierung erfolgte nach Angaben des Hersteller.

Wurden dieselben Blots mit verschiedenen Sonden hybridisiert, so wurden nach einer Hybridisierung die Sonden zunächst entfernt. Dazu wurde die Membran dreimal für jeweils 15 min bei 37°C in 100 ml Waschlösung (0,2 M NaOH, 0,1% SDS) inkubiert und in der Regel zwei- bis dreimal in 2x SSC-Lösung gewaschen, bis der pH-Wert zwischen 7,0-8,0 lag. Anschließend konnte eine erneute Hybridisierung durchgeführt werden.

### 3 Experimente und Ergebnisse

#### 3.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus Umweltproben

Ein Ziel dieser Arbeit war die Extraktion von Nukleinsäuren aus verschiedenen Umwelthabitaten in einer Qualität, die eine gute und reproduzierbare Amplifizierbarkeit der Nukleinsäuren gewährleistet und zudem die Vergleichbarkeit der auf der TGGE erzeugten Muster der DNA mit denen der RNA ermöglicht.

Nachdem ein von Felske *et al.* (1996) beschriebenes Protokoll zur Gewinnung von rRNA aus Umweltproben so modifiziert worden war (Kap. 2.3.1, 2.5.2.2), daß rRNA aus verschiedenen Bodentypen und Habitaten in zufriedenstellender Quantität und Qualität extrahiert und amplifiziert werden konnte, wurden verschiedene DNA-Extraktionsmethoden und Aufreinigungen getestet, so daß schließlich ein Protokoll ermittelt werden konnte, welches beide oben genannten Kriterien erfüllte. Hierbei wurde in Anlehnung an Führ (1996) die TGGE als Methodik eingesetzt, um die Auswirkung der Aufschlußmethodik auf die Zusammensetzung der extrahierten DNA zu untersuchen.

- **Extraktion von DNA aus Umweltproben**

Die Extraktion von DNA wurde anhand verschiedener Methoden durchgeführt, wobei sowohl indirekte als auch direkte Extraktionen mit unterschiedlichen Reinigungsschritten angewandt wurden. Für den Vergleich der Extraktionsprotokolle wurden Bodenproben aus dem FAL-Boden gewählt. Im folgenden seien die verschiedenen Protokolle und Aufreinigungen sowie deren Anwendbarkeit kurz vorgestellt.

- Variante A: indirekte Zellextraktion und Zellyse durch Tau- und Gefrierzyklen (Engelen *et al.*, 1998)
- Variante B: wie A, mit anschließender Behandlung mit Lysozym (finale Konzentration 2%, Inkubation 1 h) und SDS (finale Konzentration 3%, Inkubation 10 min)
- Variante C: Indirekte Zellextraktion und Zellyse durch Bead-beating in Phenol/SDS-Puffer (Lüdemann, 1996)
- Variante D: Indirekte Zellextraktion mit anschließender Dichtezentrifugation (nach Gebhard & Smalla, 1999) und Zellyse wie Variante C
- Variante E: parallele DNA-Extraktion: Direktextraktion mittels Bead-beating und Ultrazentrifugation (Felske *et al.*, 1996; s. Kap. 2.3.1 und 2.3.2)
- Variante F: Direktextraktion mittels Bead-beating in SDS und Lysozym (Smalla *et al.*, 1993)
- Variante G: Direktextraktion mittels Gefrier- und Tauzyklen (Schwieger & Tebbe, 1998)

Bei der indirekten Extraktion erfolgte vor dem eigentlichen Aufschluß zunächst eine Zellextraktion aus der Bodenmatrix (s. Engelen *et al.*, 1998). Die Zellfraktion wurde in 5 ml NaCl-Lösung (0,89%) aufgenommen und anschließend wie beschrieben aufgeschlossen.

- **DNA-Aufreinigungen**

Da bei einigen Extraktionsvarianten die DNA noch stark verunreinigt war, was die nachfolgende Amplifikation hemmte, wurden verschiedene gängige Aufreinigungen durchgeführt:

- Variante H: Reinigung über Wizard-Säulen  
(Wizard DNA clean-up, Promega, Madison, USA)
- Variante I: Elution aus Low-Melting Agarosegelen  
(Quiaex II Gel Extraction Kit, Quiagen, Hilden)
- Variante J: Reinigung über Glasmilch  
(Quiaex II Gel Extraction Kit, Quiagen, Hilden)
- Variante K: Reinigung durch PVP-Fällung  
(Holben *et al.*, 1988)

Die Auswirkungen auf die Amplifizierbarkeit der gewonnenen DNA, die ein entscheidendes Kriterium für weitere Untersuchungen war, sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Übersicht über die getesteten Varianten von Extraktions- und Aufreinigungspartokollen für DNA aus dem FAL-Boden. Die Amplifizierbarkeit der DNA wird als Intensität der erhaltenen PCR-Produkte dargestellt (+: Produkt, +/-: schwaches Produkt, -: kein Produkt).

Nr.	Extraktions- variante	Aufreinigungs- variante	PCR von 16S rDNA
1	A		-
2	A	H	+/-
3	B		+
4	C		-
5	C	H	+/-
6	C	I	-
7	C	J	-
8	C	K	-
9	D		+
10	E		-
11	E	H	+
12	E	I	+/-
13	E	J	-
14	E	K	-
15	F		-
16	F	H	+
17	G		-
18	G	H	+
19	G	I	+

Die PCR-Produkte wurden auf der TGGE aufgetrennt (Abb. 2). Dabei zeigte sich, daß bei einigen Varianten selbst nach Aufreinigung und Aufkonzentration der PCR-Produkte (Aufreinigung über „Quiaquick-PCR-Purifikation-Kit“ (Quiagen, Hilden) und Aufnahme der Proben in einem reduzierten Volumen) die Amplifikate nicht zu einer Musterbildung auf der TGGE führten.

Die Art der Aufreinigungsmethode führte, sobald sie eine Steigerung der Amplifizierbarkeit der DNA bewirkte, nicht zu einer Veränderung der Muster. Anhand der Varianten B und D, die nach der DNA-Extraktion schon gut amplifizierbare DNA lieferten, wurde der Einfluß der Aufreinigungsvarianten H und I auf die Musterbildung ausgetestet. Dabei zeigte sich, daß die Muster nach einer Wizardaufreinigung identisch waren mit denen nach einer Aufreinigung über Agarose-



gele. Insgesamt konnte durch eine Aufreinigung über Wizardsäulen die Amplifizierbarkeit der DNA am effektivsten gesteigert werden (s. Tab. 3), so daß diese Aufreinigungsart standardmäßig angewandt wurde.

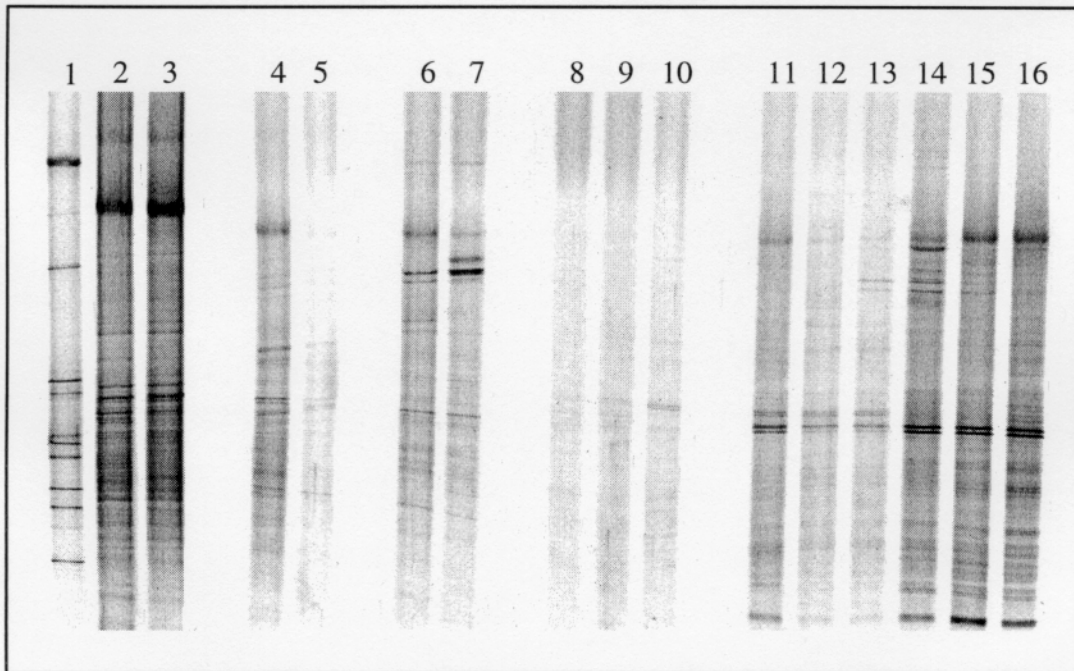


Abb. 2: Einfluß verschiedener Aufschlußvarianten von Bodenproben auf die TGGE-Muster von 16S rDNA-Sequenzen nach Amplifikation mit dem Primerpaar F984-GC/R1346.

Spur 1: Marker, Spur 2 und 3: Variante E, Wizard gereinigt (Nr. 11); Spur 4 und 5: Variante F, Wizard gereinigt (Nr. 16); Spur 6 und 7: Variante B (Nr. 3); Spur 8-10: Variante E (Nr. 10); Spur 11-13: Variante C, Wizard gereinigt (Nr. 5); Spur 14-16: Variante D (Nr. 9). Die Nummern beziehen sich auf die Extraktions- und Aufreinigungsvarianten der Tabelle 3.

Anhand des Vergleichs der TGGE-Muster zeigte sich, daß im Gegensatz zu den Aufreinigungsmethoden die Art des Extraktionsverfahrens einen großen Einfluß auf das erhaltene Muster hatte. So unterschieden sich zum Beispiel die Muster der indirekten Extraktion (Variante B und D) sowohl untereinander und auch von denen der Extraktionsmethoden E und F (Abb. 2). Aufgrund dieser Ergebnisse wird deutlich, daß ein Vergleich der TGGE-Muster aus der RNA-Fraktion mit denen aus der DNA-Fraktion einer bakteriellen Gemeinschaft nur dann zulässig ist, wenn für beide Untersuchungen dieselben Extraktionstechniken verwendet werden. Eine fast vollständige Übereinstimmung der Extraktion für RNA und DNA ist ausschließlich bei Variante E gegeben, da nur hier innerhalb einer Extraktion beide Nukleinsäurearten gewonnen werden können. Zudem erfolgt die Abtrennung der DNA von der RNA erst nach dem Zellaufschluß und den Aufreinigungsschritten durch Zentrifugation. Insofern kann bei dieser Methode davon ausgegangen werden, daß Unterschiede im TGGE-Muster der RNA im Vergleich zur DNA nicht durch die unterschiedlichen Extraktionsverfahren, sondern durch tatsächliche Unterschiede in den Aktivitätsverteilungen im Vergleich zur Struktur der bakteriellen Gemeinschaft bedingt sind (s. Kap. 3.6).

Obwohl die Amplifizierbarkeit der mittels der Variante E gewonnenen DNA durch eine Wizard-aufreinigung deutlich gesteigert werden konnte (s. Abb. 2, Spur 8-10: Amplifikate nicht aufgereinigter DNA; Spur 2 und 3: Amplifikate Wizard aufgereinigter DNA), war die Amplifikation

nicht in allen Fällen optimal. Deshalb wurde aufbauend auf dieser Extraktionsmethode versucht, DNA nicht aus dem Überstand der Ultrazentrifugation zur Ribosomenabtrennung (s. Kap. 2.3.1), sondern aus dem Pellet zu gewinnen. Bei der RNA-Gewinnung aus dem Ribosomenpellet mußte ein intensiver DNase Verdau erfolgen, um die mit abzentrifugierte DNA zu entfernen. Die Vermutung, daß diese DNA eventuell hochmolekularer und besser amplifizierbar sei, als die DNA aus dem Überstand der Ribosomenpelletierung, konnte allerdings nicht bestätigt werden. Es zeigte sich weder eine erhöhte Molarität, noch eine bessere Ausbeute der aus dem Pellet extrahierten DNA anhand einer Agarosegelelektrophorese. Nach einer Amplifikation zeigten sich zudem keine Unterschiede in den TGGE-Mustern, die aus den Pellets bzw. den Überständen der Ultrazentrifugation resultierten. Aus diesem Grund wurde die parallele DNA Extraktion aus dem Überstand der Ribosomenpelletierung beibehalten und als Standardmethode eingesetzt. Zudem konnte hierdurch RNA und DNA innerhalb der Durchführung von nur einer Extraktion gleichzeitig gewonnen werden, was neben Vorteilen bei der praktischen Durchführbarkeit auch zu einer besseren Vergleichbarkeit der RNA- und DNA-Extrakte der jeweiligen Probe führte.

- **Auswirkung der Zielsequenzkonzentration und PCR-Zykluszahl auf die TGGE-Musterbildung**

Die Auswirkung der Templatekonzentration von 16S rDNA- und rRNA-Sequenzen aus Umweltproben in der PCR auf die TGGE-Musterbildung wurde durch die Amplifikation verschiedener Verdünnungsstufen der Zielsequenzen untersucht (s. Abb. 3, Spur 1-6). Dabei zeigte sich, daß bei Verdünnungen bis 1:80 keine Veränderungen im TGGE-Muster auftraten, bei noch stärkeren Verdünnungen wurde das Muster so schwach, daß nur noch die Hauptbanden sichtbar waren, aber keine Aussagen über schwächere Banden mehr möglich waren.

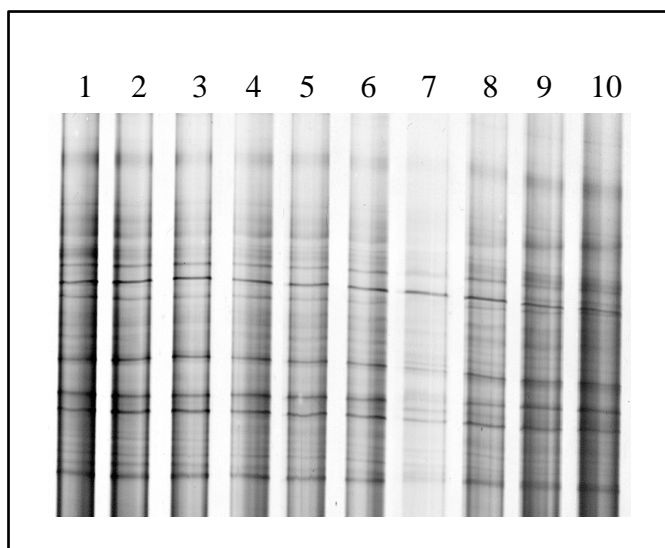


Abb. 3: Einfluß verschiedener Verdünnungsstufen und Zykluszahlen in der PCR auf das aus der Amplifikation mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 resultierende TGGE-Muster. Der in Spur 1 aufgetrennte RNA-Extrakt aus der Rhizoplane der Luzerne wurde unverdünnt mit 35 Zyklen amplifiziert. In den Spuren 2-6 sind die Amplifikate desselben Extraktes aufgetragen, die zuvor 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 bzw. 1:80 verdünnt wurden. In den Spuren 7-10 sind die Amplifikationsprodukte der unverdünnten RNA-Extrakte aufgetragen, die mit 25 (Spur 7), 30 (Spur 8), 35 (Spur 9) und 40 Zyklen (Spur 10) amplifiziert wurden.

Aus den hier analysierten Umweltproben konnte RNA und DNA nur in relativ geringen Mengen extrahiert werden, so daß eine genaue Mengenbestimmung für die Verwendung einer jeweils identischen Templatekonzentration für die anschließende Amplifikation nur sehr begrenzt möglich war. Da aber bei jeder Probenahme beispielhaft an jeweils ein bis zwei Proben gezeigt werden konnte, daß in einem relativ großen Bereich (Verdünnung bis 1:100) eine Verdünnung der PCR-Zielsequenzen zu identischen TGGE-Mustern führte, wurden nach der standardmäßigen Aufarbeitung der Umweltproben keine Konzentrationsbestimmungen vorgenommen, sondern jeweils gleiche Aliquotmengen der Extrakte für die Amplifikation eingesetzt. Eine anschließende Mengenabschätzung der PCR-Produkte durch eine Agarosegelelektrophorese ergab fast immer sehr ähnliche DNA-Konzentrationen. Die hieraus resultierenden TGGE-Muster zeigten eine hohe Kongruenz der parallelen Aufarbeitungen bezüglich der Anzahl und auch der Intensität der Banden (s. Kap. 3.6.3 und 3.6.4).

Wie die Amplifikation der 16S rRNA-Sequenzen in verschiedenen Verdünnungsstufen führten bei den hier untersuchten Umweltproben auch die Amplifikationen mit unterschiedlichen Zykluszahlen ebenfalls nicht zu einer Veränderung der TGGE-Muster. So zeigten sich bei Verwendung der verschiedenen Primerpaare bei 25, 30, 35 und 40 Zyklen gleiche Muster (beispielhaft für das Primerpaar F984-GC/R1346 s. Abb. 3, Spuren 7-10). Allerdings waren die Muster nach nur 25 Zyklen so schwach, daß die PCR-Produkte vor der Elektrophorese aufkonzentriert werden mußten. Da die Zykluszahl offenbar keinen Einfluß auf die TGGE-Musterbildung hatte, erfolgte die Amplifikation von Umweltproben bei allen Primern mit 35 Zyklen.

## **3.2 Entwicklung von PCR-Primern**

### **3.2.1 Universelle Primer zur Amplifikation der Region V1-V3 der 16S rDNA**

Zur Entwicklung von PCR-Primern für TGGE-Analysen, die das 5'-Ende der 16S rRNA erfassen, wurden die von Lane (Lane *et al.*, 1985; Lane, 1991) als universell beschriebenen Primer mit *E. coli* Bindungspositionen 10-30 und 519-536 modifiziert.

Mit der *OLIGO*-Software Version 4.0 (Rychlik & Rhoads, 1989) wurden die Primer auf ihre Eignung zur Amplifikation des gewünschten 16S rDNA-Segments überprüft, indem die Primer hinsichtlich ihrer Schmelztemperatur (allerdings ohne GC-Klammer) und Komplementarität (Vermeidung von Primer-Dimeren) aufeinander abgestimmt wurden. Anhand dieser Untersuchungen wurde der erstmals von Muyzer (Muyzer *et al.*, 1993) für DGGE-Analysen von bakteriellen Gemeinschaften eingesetzte universelle Rückwärtsprimer adaptiert und in Kombination mit dem ebenfalls adaptierten Primer F26 angewandt. Der Vorwärtsprimer F26 wurde im Vergleich zu der von Lane (1991) beschriebenen Sequenz um eine Base in 5'-Richtung verschoben, ebenso wurde der Rückwärtsprimer R519 im Vergleich zu der von Muyzer (Muyzer *et al.*, 1993) beschriebenen Sequenz um zwei Basen in 5'-Richtung verschoben und deckt damit die von Lane (1991) beschriebene konservierte Region ab.

Anhand des Computerprogrammes *POLAND* (Steger, 1994) wurde die relative elektrophoretische Beweglichkeit von DNA-Molekülen in Temperatur-Gradientengelen berechnet. Die für die Berechnung der Schmelzkurven eingesetzten 16S rDNA-Sequenzen von Bakterienstämmen wurden

aus der EMBL-Datenbank übernommen. Die errechnete relative Mobilität verschiedener PCR-Produkte, die mit dem Primerpaar F26/R519-GC-1 und R519-GC-2 amplifiziert wurden, zeigte eine prinzipielle Auftrennbarkeit der Amplifikate auf der TGGE.

Die von Engelen (1998) entwickelte GC-Klammer 1 führt zur Bildung von Primer-Dimeren und kann durch komplementäre Basenpaarungen zwei verschiedene Haarnadelstrukturen ausbilden, die einen Abbruch der GC-Klammer während der Amplifikation bewirken kann. Daher wurde eine GC-Klammer (GC-2) entwickelt, die nach Auswertungen anhand der *OLIGO*-Software keine Primer-Dimeren ausbildet. Eine Vermeidung von komplementären Basenpaarungen innerhalb der GC-Klammer konnte zwar nicht vollständig erreicht werden; allerdings zeigten die Berechnungen, daß die hier auftretende Haarnadelstruktur eine erheblich verringerte Stabilität aufwies.

Die GC-Klammer 2 wurde mit dem Primer R519 kombiniert. Im TGGE-Gel zeigten jedoch nur Amplifikate einiger weniger Reinkulturen distinkte Banden. Von Amplifikaten aus Umweltproben konnte selbst nach Optimierung der PCR kein erkennbares Bandenmuster erhalten werden. Da auch andere, in ähnlicher Weise modifizierte GC-Klammern in Kombination mit dem Primer F984 in der Anwendung zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen führten (Engelen, 1998), wurde die ursprüngliche GC-Klammer 1 mit dem Primer R519 kombiniert. Hiermit zeigten alle untersuchten Reinkulturen distinkte Banden in der TGGE. Amplifikate aus Umweltproben führten jedoch nicht zu einem Bandenmuster zufriedenstellender Qualität, obwohl einige Sequenzen als distinkte Banden erkennbar waren. Auch eine Optimierung der PCR-Reaktion durch Amplifikation mittels einer „Touch-down“-PCR (Kap. 2.5.2.1) führte zu keiner Verbesserung des TGGE-Bandenmusters.

Anhand von Berechnungen mit der *POLAND*-Software ergaben sich keine Beeinflussungen des theoretischen Trennverhaltens von PCR-Amplifikaten in einer Gradienten-Gelelektrophorese, wenn die GC-Klammer mit dem Vorwärtsprimer F26 kombiniert wurde. In der Anwendung hingegen konnte durch diese Variation eine deutliche Verbesserung erreicht werden. Sowohl Reinkulturen als auch Nukleinsäuren aus Umweltproben zeigten nach Amplifikation mit dem Primerpaar F26-GC-1/R519 distinkte Banden auf der TGGE. Anhand von TGGE-Analysen mit senkrechten Gradienten (Abb. 4) konnte der Temperaturbereich mit einer optimalen Trennleistung ermittelt werden und so das Auflösungsvermögen der TGGE erhöht werden.

Durch die weitgehende Optimierung der Amplifikations- und Elektrophoresebedingungen konnten sowohl DNA- als auch RNA-Extrakte aus verschiedenen Umwelthabitaten (Boden, Rhizosphäre und Rhizoplane) einer Analyse zugänglich gemacht werden (Abb. 5).

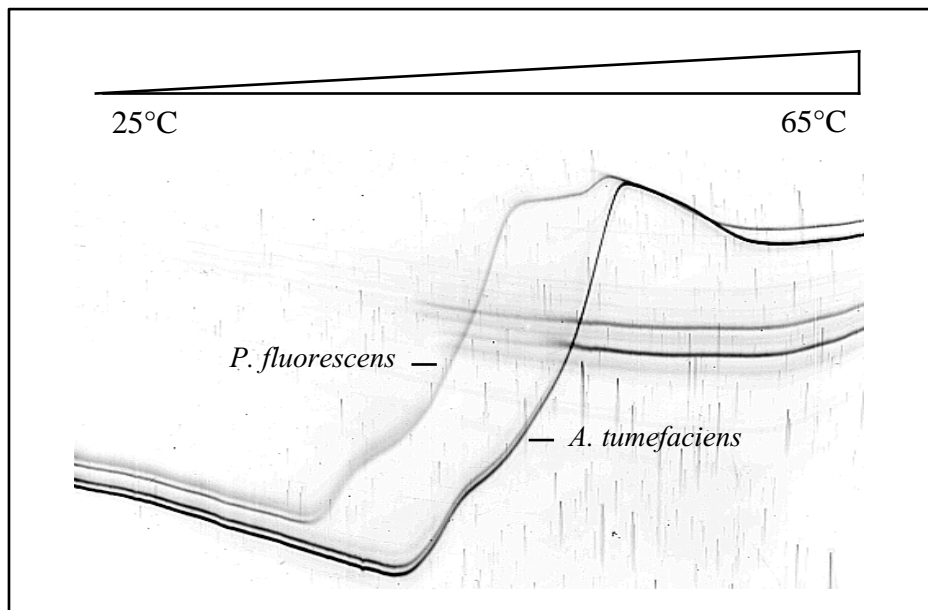


Abb 4: Schmelzkurven von PCR-Produkten des Primerpaares F26-GC/R519. Der Temperaturgradient von 25°C-65°C wurde senkrecht zur Elektrophoreserichtung angelegt. Je 20 µl der Amplifikate von *Agrobacterium tumefaciens* (DSM 30205) und *Pseudomonas fluorescens* (R2f) wurden auf einem durchgehenden Auftragslot aufgetragen. Laufbedingungen: Nach Probenauftrag 60 min Vorlauf bei 20 mA ohne Temperaturgradient (20°C), anschließend 3,5 h Laufzeit bei 28 mA und eingestelltem Temperaturgradienten.

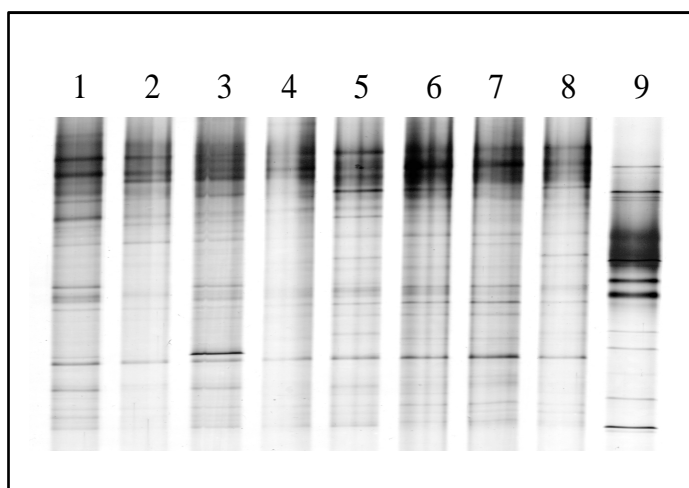


Abb. 5: Aus der Amplifikation mit dem Primerpaar F26-GC/R519 resultierende TGGE-Bandenmuster verschiedener RNA-Extrakte aus Umweltproben. Aufgetragen sind Amplifikate unabhängiger Wiederholungen aus der Rhizoplane von Roggenpflanzen, die in verschiedenen Böden angezogen wurden. Spuren 1-4: FAL-Bodentyp, Spuren 5-8: STM-Bodentyp, Spur 9: Marker.

### 3.2.2 Primer R1463 zur Amplifikation von *S. meliloti* und verwandten Sequenzen

Um einen Primer zu entwickeln, der *S. meliloti* und verwandte Sequenzen erfaßt, wurden anhand des *arb*-Programmpakets mit der Sondensuchfunktion („probe-design“) verschiedene Bereiche ausgewählt, die möglichst selektiv *S. meliloti*-verwandte Sequenzen erfassen. Die Überprüfung der erfaßten Zielsequenzen wurde mit der „probe-match“-Funktion dieser Software durchgeführt. Der Bereich 1463-1481 der 16S rDNA (*E. coli* Numerierung) wurde schließlich näher getestet, da hier im Gegensatz zu einigen anderen möglichen Primersequenzen alle Sinorhizobien-Arten, aber nur eine begrenzte Anzahl weiterer Sequenzen aus den  $\alpha$ -Proteobakterien theoretisch erfaßt wurden. Nach Optimierung der Primersequenz mittels der *OLIGO*-Software erfolgte die Ermittlung möglicher Zielsequenzen des Primers R1463 anhand der RDP-Datenbank (Maidak *et al.*, 1997), wobei die Gesamtheit der prokariotischen SSU rRNA-Sequenzen der Datenbank mit einbezogen wurde. Wurden keine Fehlpaarungen bei der Analyse zugelassen, befanden sich alle Zielsequenzen innerhalb der *Rhizobium*-*Agrobacterium* Gruppe, wobei nur Sequenzen aus den folgenden Untergruppen erfaßt wurden: *Agrobacterium assemblage*, *Rhizobium leguminosarum*-, *Rhizobium tropici*-, *Sinorhizobium fredii*-, *Bartonella*- und *Rhizobium loti*-Untergruppe.

Wurden bei der Analyse bis zu drei Fehlpaarungen zugelassen, so konnten neben einem Vertreter der  $\epsilon$ -Proteobakterien (*Campylobacter sp.*), der sich in der Zielsequenz nicht von *Blastomonas natatoria* und *Sphingomonas paucimobilis* ( $\alpha$ -Proteobakterien) unterschied, auch einige Sequenzen aus der Gruppe von *Clostridium* und verwandten Sequenzen erfaßt werden. Die erfaßten Grampositiven Sequenzen zeichneten sich jedoch alle durch drei Fehlpaarungen am 3'-Ende der Primersequenz aus, so daß eine Amplifikation nicht zu erwarten war. Alle weiteren möglichen Zielsequenzen befanden sich innerhalb der  $\alpha$ -Proteobakterien.

Um die tatsächliche Spezifität des Primers zu ermitteln, wurde von verschiedenen Reinkulturen DNA extrahiert und für eine Amplifikation mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 eingesetzt. Insgesamt wurden 33 Sequenzen von  $\alpha$ -Proteobakterien und als Kontrolle 15 Sequenzen von nicht- $\alpha$ -Proteobakterien aus verschiedenen phylogenetischen Gruppen untersucht (Tab. 4). Hierbei wurden gezielt einige Sequenzen auf ihre Amplifizierbarkeit überprüft, die anhand der theoretischen Berechnung von Zielsequenzen mittels der RDP- und *arb*-Datenbank trotz weniger Fehlpaarungen eine Amplifikation als möglich erschienen ließen. So wurde beispielsweise eine Reinkultur von *Blastomonas natatoria* getestet, die allerdings kein Amplifikat mit dem Primer R1463 ergab. Um die prinzipielle Amplifizierbarkeit der DNA-Extrakte zu testen, wurde als Positivkontrolle jeweils eine PCR mit dem universellen Primerpaar F984-GC/R1346 durchgeführt, wobei alle untersuchten Sequenzen ein Signal ergaben.

Es zeigte sich, daß eine Basenfehlpaarung die Amplifizierbarkeit nicht beeinflusste, auch dann nicht, wenn diese am 3'-Ende der Primersequenz vorlag (z.B. *Agrobacterium rubi*). Insgesamt konnte eine Tolerierung von maximal zwei Fehlpaarungen für eine Amplifikation detektiert werden – allerdings nur dann, wenn beide Fehlpaarungen nicht innerhalb des 3'-Endes der Primersequenz lagen (s. z.B. *Bradyrhizobium japonicum*), bzw. wenn nicht die erste Base am 3'-Ende des Primers betroffen war (z.B. *Rhodospirillum fulvum* im Vergleich zu *Blastobacter aggregatis*). Mehr als zwei Fehlpaarungen verhinderten eine Amplifikation (s. *Blastomonas natatoria*, *Rhodobacter capsulatus*). Unter den hier vorliegenden Amplifikationsbedingungen (Annealingtemperatur 61°C) konnten alle untersuchten *Rhizobium*- und *Sinorhizobium*-Sequenzen erfaßt werden, sowie einige

weitere Sequenzen aus der *Rhizobium-Agrobacterium* und *Rhodopseudomonas fulvum* Gruppe. Da offensichtlich nur zwei Fehlpaarungen unter den oben genannten Bedingungen bei einer Amplifikation toleriert wurden, führten nicht alle untersuchten  $\alpha$ -Proteobakterien und keine der getesteten nicht- $\alpha$ -Proteobakterien zu einer Amplifikation.

Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte eine erneute theoretische Berechnung möglicher Zielsequenzen anhand der RDP-Datenbank, wobei nur zwei Fehlpaarungen unter den genannten Bedingungen zugelassen wurden, um jene Sequenzen zu erfassen, die sehr wahrscheinlich mit dem Primer R1463 erfaßbar sind. Die Analyse ergab als mögliche Zielsequenzen nur Sequenzen innerhalb der  $\alpha$ -Proteobakterien, wobei aus drei Gruppen der  $\alpha$ -Proteobakterien (*Rickettsia* und Verwandte, *Sphingomonas*- und *Rhodospirillum salexigens*-Gruppe) keine Sequenzen erfaßt wurden. Aus der *Rhodobacter*-, *Hyphomonas*- und *Caulobacter*-Gruppe sind wahrscheinlich nur sehr wenige Sequenzen jeweils erfaßbar, aus dem *Rhodospirillum rubrum*-Assemblage nur Sequenzen aus der *Azospirillum*- und *Acidiphilium*-Untergruppe. Der überwiegende Teil der erfaßbaren Sequenzen wurde anhand der RDP-Einteilung in die *Rhizobium-Agrobacterium* Gruppe eingeordnet, wobei alle in die Datenbank eingeordneten Sinorhizobien-Sequenzen erfaßt wurden. Abgesehen von dem *Rhodomicrobium vannielii*- und *Pedomicrobium*-Assemblage sind in unterschiedlichem Ausmaß Sequenzen aus allen anderen 14 Untergruppen der *Rhizobium-Agrobacterium* Gruppe prinzipiell erfaßbar.

Um die selektive Amplifikation des Primers darzustellen, wurden vier verschiedene Modellgemeinschaften, bestehend aus 16S rDNA Sequenzen von je vier  $\alpha$ -Proteobakterien, die mit dem Primer R1463 amplifizierbar waren, und vier nicht- $\alpha$ -Proteobakterien, hergestellt. Die Modellgemeinschaften enthielten

- (I) gleiche Mengen an Ziel-DNA,
- (II)  $\alpha$ -proteobakterielle Sequenzen 10fach verdünnt,
- (III)  $\alpha$ -proteobakterielle Sequenzen 100fach verdünnt und
- (IV)  $\alpha$ -proteobakterielle Sequenzen 1000fach verdünnt.

Die Modellgemeinschaften wurden sowohl mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 als auch F984-GC/R1463 amplifiziert und auf der TGGE aufgetrennt (Abb. 6). Die aus der Amplifikation mit dem Primer R1346 resultierenden Bandenmuster spiegelten das Verhältnis der Ziel-DNA-Sequenzen wider: Während die nicht- $\alpha$ -proteobakteriellen Sequenzen in den vier Gemeinschaften dieselben Intensitäten aufzeigten, konnten bei einer 1000fachen Verdünnung der  $\alpha$ -proteobakteriellen Sequenzen diese nicht mehr detektiert werden und nur sehr schwach bei einer 100fachen Verdünnung (Abb. 6, Spur 1-4). Die TGGE-Muster nach der Amplifikation mit dem Primer R1463 enthielten nur Banden der  $\alpha$ -Proteobakterien. Auch bei einer 1000fach höheren Konzentration an nicht- $\alpha$ -proteobakteriellen Sequenzen (Spur 8) wurden diese Sequenzen nicht amplifiziert, was die Spezifität des Primers R1463 belegt.

Das Migrationsverhalten verschiedener  $\alpha$ -proteobakterieller Sequenzen in der TGGE nach Amplifikation mit dem Primer R1463 zeigte, daß die verschiedenen Gattungen gut voneinander trennbar waren (teilweise dargestellt in Abb. 6, Spur 5-8). Nur die Amplifikate von *Rhizobium*

*leguminosarum* und *Sinorhizobium meliloti* zeigten ein vergleichbares Laufverhalten. Allerdings konnten nicht immer alle Arten einer Gattung anhand ihres Laufverhaltens voneinander getrennt werden. So zeigten im Gegensatz zu den in Tab. 4 aufgeführten Agrobakterien- und Rhizobien-Arten die untersuchten Phyllobakterien-, Mesorhizobien- und zwei Sinorhizobien-Arten jeweils untereinander ein identisches Migrationsverhalten.

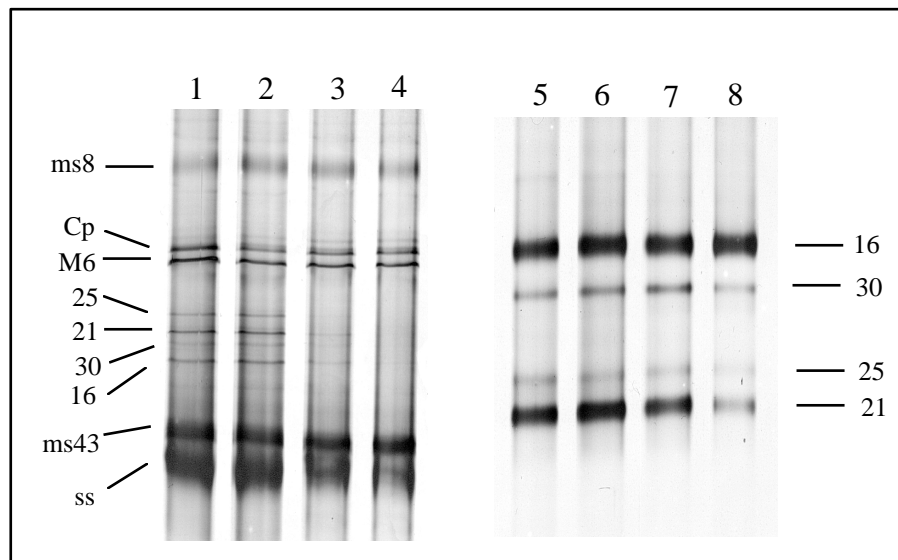


Abb. 6: Untersuchungen von Modellgemeinschaften bestehend aus 16S rDNA Sequenzen von je vier  $\alpha$ -Proteobakterien (*Phyllobacterium rubiacerarum* (16), *Rhizobium galegae* (21), *Rhizobium leguminosarum* (25), *Sinorhizobium terangae* (30)) und vier nicht- $\alpha$ -Proteobakterien (*Variovorax paradoxus* (ms 8), *Pseudomonas putida* (ms 43), *Clostridium pasteurianum* (Cp), *Nocardia asteroides* (M6)). Die Stammbezeichnung bzw. Herkunft der Stämme ist in Tab. 4 dargestellt. Die Modellgemeinschaften wurden mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 (Spur 1-4) und F984-GC/R1463 (Spur 5-8) amplifiziert und auf der TGGE aufgetrennt. Die Gemeinschaften enthielten gleiche Mengen an Template-DNA (Spur 1 und 5),  $\alpha$ -proteobakterielle Sequenzen 10fach verdünnt (Spur 2 und 6),  $\alpha$ -proteobakterielle Sequenzen 100fach verdünnt (Spur 3 und 7) und  $\alpha$ -proteobakterielle Sequenzen 1000fach verdünnt (Spur 4 und 8). ss: rötlicher gefärbter DNA-Einzelstrang.



Tab. 4: Auf Amplifizierbarkeit mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 untersuchte Bakterienspezies mit Angabe der Abweichungen in den Zielsequenzen des Primers R1463. Die Zuordnung der Bakterienspezies erfolgte anhand der RDP-Datenbank.

Spezies	Stamm	Ziel-Sequenz (5'-3') CAGCU=AACCACGGUAGGGUCAGC=GACUG	Zuordnung anhand der RDP-Datenbank	PCR
			<b>Alpha-Proteobakterien</b>	
			<b>Rhizobium Agrobacterium-Gruppe</b>	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	ATCC 9930	-----	<i>Sinorhizobium fredii</i> Untergruppe	+
<i>Sinorhizobium teranga</i>	ORS 1009	-----	<i>Sinorhizobium fredii</i> Untergruppe	+
<i>Sinorhizobium saheli</i>	ORS 609	-----	<i>Sinorhizobium fredii</i> Untergruppe	+
<i>Rhizobium galegae</i>	ATCC 43677	-----	<i>Agrobacterium assemblage</i>	+
<i>Rhizobium giardini</i>	H 152	-----	keine Zuordnung möglich	+
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	ORS 662	-----	<i>Rhizobium leguminosarum</i> Untergruppe	+
<i>Rhizobium elti</i>	CFN 42	-----	<i>Rhizobium leguminosarum</i> Untergruppe	+
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	LMG 1	---GC=-----	<i>Rhizobium loti</i> Untergruppe	+
<i>Phyllobacterium rubiacearum</i>	LMG 2	---GC=-----	<i>Rhizobium loti</i> Untergruppe	+
<i>Rhizobium ciceri</i>	ATCC 51585	keine Sequenz vorhanden	<i>Rhizobium loti</i> Untergruppe	+
<i>Rhizobium mediterraneum</i>	UPMCA 36	---GC=G-----	<i>Rhizobium loti</i> Untergruppe	+
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	CCBAU 2609	---GC=G-----	<i>Rhizobium loti</i> Untergruppe	+
<i>Mesorhizobium loti A</i>	NZG 6124	---GC=G-----	<i>Rhizobium loti</i> Untergruppe	+
<i>Rhizobium tropici</i>	CIAT 899	-----	<i>Rhizobium tropici</i> Untergruppe	+
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	LMG 2408	-----	<i>Rhizobium tropici</i> Untergruppe	+
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATCC 23308	-----	<i>Agrobacterium assemblage</i>	+
<i>Agrobacterium vitis</i>	CFBP 2621	---G=-----	<i>Agrobacterium assemblage</i>	+
<i>Agrobacterium rubi</i>	LMG 17935	---GC=G-----	<i>Agrobacterium assemblage</i>	+
<i>Mycoplana dimorpha</i>	ATCC 4279	---GC=G-----	<i>Brucella assemblage</i>	+
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	ATCC 49188	---GC=G-----	<i>Brucella assemblage</i>	+
<i>Zoogloea ramigera</i>	Umweltisolat	---GC=G-----	<i>Brucella assemblage</i>	+
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	ATCC 43989	---GC=G-----U=-----	<i>Rhodopseudomonas viridis</i> Untergruppe	+
<i>Blastobacter aggregatis</i>	ATCC 43293	-----C-----G-----U=-----	<i>Blastobacter</i> Untergruppe	+
<i>Bradyrhizobium sp lupinus</i>	LL 13	---C=GG-----	<i>Bradyrhizobium</i> Untergruppe	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	USDA 110	---C=GG-----	<i>Bradyrhizobium</i> Untergruppe	-
			<b>Rhodospirillum fulvum Gruppe</b>	
<i>Azospirillum lipoferum</i>	4B	---C=-----A-----	<i>Azospirillum lipoferum</i> Untergruppe	+
<i>Azospirillum brasilense</i>	SP 7	---C=-----CA-----	<i>Azospirillum lipoferum</i> Untergruppe	+
<i>Azospirillum amazonense</i>	DSM 2787	---C=G-----C-----	<i>Azospirillum lipoferum</i> Untergruppe	-
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	DSM 6361	---C=G-----A-----	<i>M. gryphiswaldense</i> Untergruppe	-
<i>Rhodospirillum fulvum</i>	DSM 113	---C=G-----A-----	<i>M. gryphiswaldense</i> Untergruppe	-
			<b>Rhodobacter Gruppe</b>	
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	ATCC 11166	-----G-----C-----U=-----	<i>Rhodobacter capsulatus</i> Untergruppe	-
			<b>Sphingomonas Gruppe</b>	
<i>Blastomonas natatoria</i>	DSM 3183	---GC=G-----G-----U=-----	<i>Rhizomonas suberifaciens</i> -Untergruppe	-
<i>Sphingomonas capsulata</i>	ATCC 14666	---C=G-----C-----U=-----	<i>Sphingomonas subarctica</i> Untergruppe	-
			<b>Nicht-Alpha-Proteobakterien</b>	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	DSM 525	---G=GC-G-A---G---A-U---U=---	Low GC	-
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 402	---C=GC-G-A---G---ACAGAU=---U=---	Low GC	-
<i>Actinoplanes phillipiensis</i>	JCM 3001	G---C=GU-G-A---.....=.....	High GC	-
<i>Nocardia asteroides</i>	N3	G---C=GU-G-A---G---A-G-C=---..	High GC	-
<i>Kineosporia aurantiaca</i>	JMC 3230	G-NNN=GU-G-A---G---ACGUGGC=---..	High GC	-
<i>Nocardiopsis atra</i>	ATCC 31511	keine Sequenz vorhanden	High GC	-
<i>Actinomadura malachitica</i>	DSM 43462	keine Sequenz vorhanden	High GC	-
<i>Variovorax paradoxus</i>	DSM 645	GC-A=U-----C-----UC-U=-----	Beta-Proteobakterien	-
<i>Comamonas acidovorans</i>	DSM 39	GC=---U-U-----CG-----UU-U=-----	Beta-Proteobakterien	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	GSPB 450	G-----U-----UU-GU-A-UCAU=-----	Gamma-Proteobakterien	-
<i>Erwinia carotovora</i>	DSM 30168	GC=---U-----UU-GU-A-UCAU=---C=	Gamma-Proteobakterien	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R2f	GC-G=U-----GU-A-UCAU=-----	Gamma-Proteobakterien	-
<i>Aeromonas schubertii</i>	DSM 4882	GC-U=U-----GU-A-UCAU=-----	Gamma-Proteobakterien	-
ms 43 ( <i>Pseudomonas putida</i> )	Umweltklon *	keine Sequenz vorhanden	Gamma Proteobakterien	-
<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	DSM 7299	-UA-C=UU---A---G-AU-U---Y=-----	Epsilon-Proteobakterien	-

Übereinstimmende Basen zu der Zielsequenz des Primers R1463 sind durch Striche (-) gekennzeichnet. \*Die Zuordnung der Klonsequenz ms 43 aus der Klonbibliothek Bielefeld erfolgte anhand einer Partialsequenzanalyse (ca. 1300 Bp; S. Weidner, mündliche Mitteilung).

### 3.3 Etablierung einer Methode zur Auswertung von TGGE-Gelen

Um Bandenmuster unter Berücksichtigung der Bandenintensität auf verschiedenen TGGE-Gelen prinzipiell miteinander vergleichen zu können, müssen mehrere Kriterien erfüllt sein. So muß die Signalstärke der silbergefärbten Nukleinsäuren auf der TGGE in einem linearen Verhältnis zu der aufgetragenen Nukleinsäurekonzentration stehen, zudem muß die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Gelen gewährleistet sein. Ebenso müssen die Parameter zur densitometrischen Auswertung ermittelt und standardisiert werden, die eine reproduzierbare Quantifizierung und somit die Vergleichbarkeit der Muster gewährleisten.

Um das Verhältnis der aufgetragenen DNA-Konzentration zur Signalstärke der silbergefärbten Nukleinsäuren zu ermitteln, wurden verschiedene PCR-Produkte von Reinkulturen mehrfach in verschiedenen Verdünnungen auf der TGGE aufgetrennt. Hierbei zeigte sich, daß in einem bestimmten Bereich („Peak OD“: 0,015-0,6, bzw. „Trace OD“ als das Peakintegral: 0,01-0,8 [OD x mm]) die Linearität gewährleistet war, wobei allerdings eine Vervierfachung der aufgetragenen Nukleinsäurekonzentration nur zu einer Verdoppelung der Signalstärke führte. Bei sehr geringen, an der Detektionsgrenze liegenden, als auch bei sehr hohen Signalstärken war hingegen keine Korrelation mehr möglich. Bei der Analyse von Bandenmustern aus Umweltproben, die aus der Amplifikation mit universellen Primern resultierten, wurden allerdings in keinem Fall einzelne Sequenzen so stark amplifiziert, daß sie Signalstärken erreichten, die oberhalb des linearen Bereiches lagen. Banden, die so schwach gefärbt waren, daß sie in dem Bereich lagen, in dem ebenfalls eine Korrelation nicht mehr gegeben war, wurden bei einem Mustervergleich nicht berücksichtigt. Insofern ist unter diesen Voraussetzungen die Annahme gerechtfertigt, daß die Intensität der detektierten Banden mit dem DNA-Gehalt in der jeweiligen Bande korreliert.

Die hier angewandte Silberfärbung führte zu einer Hintergrundfärbung der Gele, die unterschiedlich stark ausgeprägt war. Es zeigte sich allerdings, daß durch die von der verwendeten Software gebotene Möglichkeit des Abzugs des Hintergrundsignals über das gesamte Gel Unterschiede in der Färbung zwischen verschiedenen Gelen ausgeglichen werden konnten.

Um die Intensität der einzelnen Banden vergleichen zu können, war zusätzlich der Hintergrundabzug jeder einzelnen Gelspur auf eine einheitliche Basislinie notwendig, da ansonsten die unterschiedlich starken Hintergrundsignale in den einzelnen Gelspuren die Berechnung der Bandenintensitäten verfälschten.

Die Etablierung dieses Verfahrens erfolgte sowohl an Umweltproben als auch an Modellgemeinschaften, die aus PCR-Gemischen hergestellt wurden, welche sich in der Anzahl und Quantität der jeweiligen Sequenzen (6-15 Reinkultursequenzen) unterschieden, und die jeweils auf verschiedenen TGGE-Gelen aufgetrennt wurden. Hierbei zeigte sich, daß durch die Standardisierung der einzustellenden Parameter bei der Gelauswertung ein Mustervergleich auch zwischen verschiedenen Gelen möglich war.

Um die Ähnlichkeiten der resultierenden TGGE-Muster darzustellen, wurde eine Clusteranalyse anhand der *Diversity Database* Software durchgeführt, wobei die Abgleichung der Bandenmuster auf verschiedenen Gelen anhand von Markerproben erfolgte (s. Kap. 2.7). Generell problematisch bei einer Clusteranalyse ist allerdings die Bandenzuordnung, d.h. die Festlegung, ob zwei Banden

mit ähnlichem Laufverhalten auch tatsächlich dieselbe Position einnehmen und somit zu demselben Bandentyp zugeordnet werden können. Anhand der Auswertung von Modellgemeinschaften (s. oben) zeigte sich, daß eine falsche Zuordnung von schwachen Banden nur eine geringe Auswirkung auf die berechnete Ähnlichkeit der Muster hatte, dagegen bewirkte eine unterschiedliche Zuordnung dominanter Banden eine stärkere Änderung der Ähnlichkeitswerte. Da nicht immer eine entsprechende Bandenzuordnung zu einem Bandentyp mit ausreichender Sicherheit erfolgen kann, bietet die hier verwendete Software die Möglichkeit, die Zuordnung einzelner Banden offen zu lassen, wobei das Vorkommen der Bande und auch deren Intensität trotzdem mit in die Berechnung einbezogen wird.

Anhand von vielfältigen Vorversuchen erwies sich die Anwendung dieser Option bei einer nicht mit großer Sicherheit erfolgenden Zuordbarkeit einzelner Banden zu einem bestimmten Bandentyp in einem komplexen Bandenmuster als sinnvoll.

Die Berechnung der Ähnlichkeit erfolgte durch den Dice-Koeffizienten, die Clusterung anhand des UPGMA-Algorithmus (Diversity Database User Guide, 1996), da diese Berechnungen als traditionell gut geeignete Methoden angesehen werden (Sackin & Jones, 1993). Die Verwendung anderer Koeffizienten (Jaccard-Koeffizient) führte zu veränderten Absolutwerten der Ähnlichkeit, die relative Ähnlichkeit der Muster untereinander blieb allerdings in vergleichbaren Größenordnungen. Eine Berechnung anhand des Pearson-Korrelations-Koeffizienten war mit der verwendeten Software nicht möglich.

### 3.4 V6-Sonden

Um einzelnen Banden aus dem TGGE-Muster Isolate oder Klonsequenzen einer Klonbank zuzuordnen zu können, wurde das Migrationsverhalten der 16S rDNA-Amplifikate der Isolate bzw. Klone auf der TGGE verglichen. Da ein identisches Laufverhalten von PCR-Produkten durch das vergleichbare Schmelzverhalten der Moleküle bedingt ist, aber nicht notwendigerweise auf Sequenzidentität hinweist, wurde eine Methode angewandt, die durch die Verwendung von V6-Sonden eine Verbindung zwischen TGGE-Banden und Klonsequenzen ermöglichte (Heuer *et al.*, 1999; Kap. 2.8).

Von einer Klonsequenz (ms 12) der in dem Verbundprojekt von der Universität Bielefeld angelegten Klonbank, die ein identisches Laufverhalten zu einer im TGGE-Muster dominierenden Bande aufwies, wurde eine V6-Sonde hergestellt (s. Kap. 2.8). Hierbei wurden die Primersequenzen der Sonde zunächst nicht entfernt. Anschließend wurde diese Sonde für eine Hybridisierung der entsprechenden elektrogeblotteten TGGE-Bandenmuster eingesetzt (Abb. 8b). Die Sondenspezifität stellt sich allerdings als äußerst unzureichend heraus, da mehrere Banden im DNA- und RNA-TGGE-Muster (Abb. 8b, Spur 2-4) Signale ergaben. Dies wurde wahrscheinlich dadurch bedingt, daß aufgrund der universellen Primerbindungsstellen ca. ein Drittel der Sonde aus phylogenetisch konservierten Nukleotiden bestand, die die Spezifität stark herabsetzten. Aus diesem Grund wurden nach der Amplifikation die konservierten Primersequenzen des Amplifikates enzymatisch entfernt (Kap. 2.8.1), so daß nur noch die hypervariable V6-Region als Sonde fungierte (s. Abb. 7).

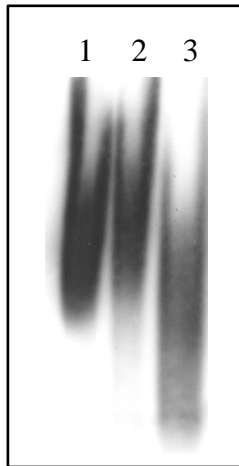


Abb. 7: Herstellung modifizierter V6- Sonden.

Spur 1 enthält das 98 Bp PCR-Produkt der nicht modifizierten Sonde nach Amplifikation mit dem die V6-Region flankierenden Primerpaar F985-PTO und R1046-PTO. Durch Verwendung dieser Primer erfolgte der anschließende Verdau mit einer doppelstrang-spezifischen 5'-3' Exonuklease nur bis zu der Phosphothionatbindung am 3'-Ende der Primer. Die partiell einzelsträngige Sonde nach dieser Hydrolyse ist in Spur 2 dargestellt. Der zu der Primersequenz komplementäre, übriggebliebene Einzelstrang wurde nachfolgend mit einer einzelstrang-spezifischen Nuklease abgedaut. Die so modifizierte 62 Bp Sonde ist in Spur 3 dargestellt.

Die Sonde und die dargestellten Zwischenprodukte wurden durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, elektrophoretisch und anschließend anhand ihrer Chemilumineszenz detektiert.

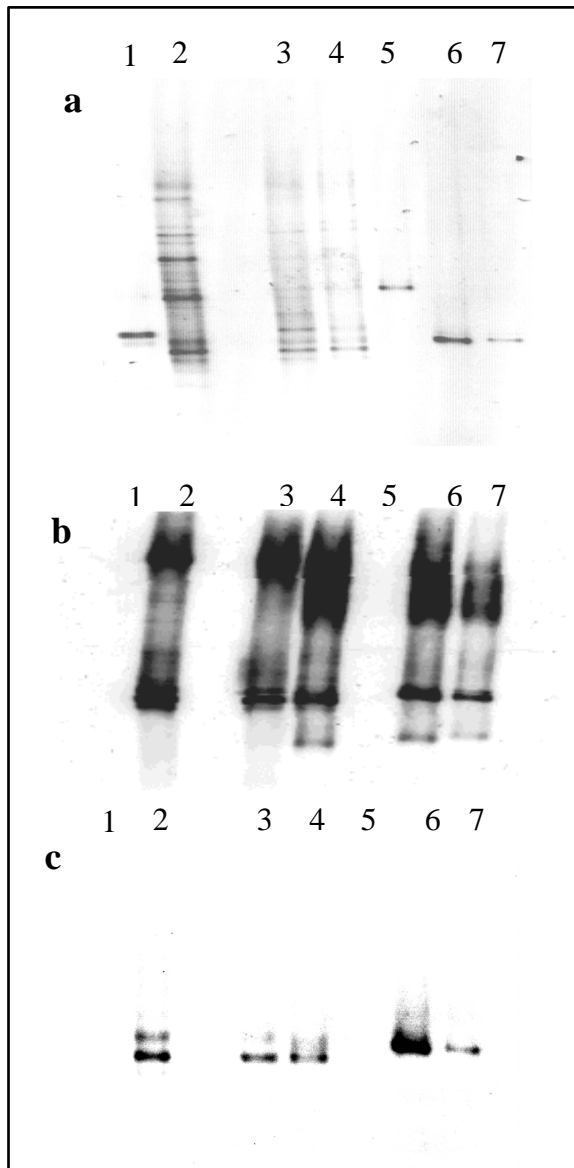


Abb. 8: Hybridisierung eines TGGE-Geles mit einer V6-Sonde unterschiedlicher Spezifität.

a: SYBR-Green gefärbtes TGGE-Gel der nach der Amplifikation der DNA (Spur 2) und RNA (Spur 3 und 4) resultierenden Bandenmuster der bakteriellen Gemeinschaft der Rhizoplane von Luzerne. Die aus dem Bandenmuster der RNA eluierte Sequenz a3 (Spur 7) zeigte ein identisches Laufverhalten zu der 16S rDNA-Sequenz des Klon ms 12 (Verwandtschaft zu *Pseudomonas putida*, Spur 6). Zusätzlich wurden 16S rDNA Amplifikate eines weiteren Klonen der Klonbibliothek (Verwandtschaft zu *Variovorax paradoxus*, Spur 5) und eines Klonen von *S. meliloti* (Spur 1) aufgetrennt. Das elektrophoretische Gel wurde hybridisiert mit einer nicht modifizierten V6-Sonde der Konsequenz ms 12 (b) und mit einer durch den Abbau der Primersequenz modifizierten V6-Sonde derselben Klonsequenz (c).

Nach Ermittlung der Reaktionsbedingungen, unter denen eine vollständige Entfernung der Primersequenzen stattfand, zeigte die Hybridisierung des geblotteten TGGE-Gels mit dieser modifizierten V6-Sonde eine erheblich gesteigerte Spezifität (s. Abb. 8c). Zwar hybridisierte die Sonde wider Erwarten noch mit zwei weiteren Sequenzen aus den TGGE-Mustern der DNA und RNA (Spur 2-4), eine anschließende Sequenzanalyse dieser TGGE-Banden (s. Kap. 3.6.1) ergab allerdings eine Homologie von 100% in der V6-Region, was eine Unterscheidung dieser Sequenzen mittels einer V6-Sonde grundsätzlich verhinderte.

Um die SONDENSPEZIFITÄT darzustellen, wurde die Anzahl der Nukleotid-Fehlpaarungen ermittelt, die eine Hybridisierung der modifizierten V6-Sonden verhinderte.

Hierzu wurden Untersuchungen anhand von zehn 16S rDNA-Klonsequenzen durchgeführt, die aufgrund der Sequenzanalyse als *Pseudomonas putida* eingeordnet wurden (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Weidner). In der V6-Region zeigten drei Klonsequenzen eine Deletion einer Base an Position 1028 und eine Klonsequenz einen Basenaustausch (G gegen A) an Position 1036 (*E. coli* Numerierung) gegenüber den anderen Klonsequenzen. Bei nachfolgenden Dot-Blot Hybridisierungen konnten allerdings diese Sequenzunterschiede von je einer Base bei der Verwendung von modifizierten V6-Sonden von einem dieser Klone nicht erfaßt werden, da alle Klonsequenzen ein Signal ergaben.

Weitere Untersuchungen wurden anhand von 15 nahe verwandten 16S rDNA-Klonsequenzen aus der Gruppe der  $\beta$ -Proteobakterien (*Rubrivivax*-Gruppe, ebenfalls freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Weidner) durchgeführt. Von einer Klonsequenz wurde eine modifizierte V6-Sonde hergestellt, wobei sich die V6-Region dieser Klonsequenz von denen der anderen Klonsequenzen in 2, 3, 6, 10 oder 17 Nukleotiden unterschied. Die einzige Klonsequenz, die bei der nachfolgenden Dot-Blot Hybridisierung ein Signal ergab, war die, von der die V6-Sonde hergestellt wurde. Insofern war die Hybridisierungsstringenz der modifizierten Sonde so hoch, daß Unterschiede von zwei Basen in der Zielsequenz differenziert werden konnten. Die Klonsequenz, die in der V6-Region in zwei Basen differierte, hatte ein A an Position 1001 bzw. T an Position 1039 (*E. coli* Numerierung) im Gegensatz zu G bzw. C in der SONDENSEQUENZ.

### 3.5 Unspezifische Bandenbildung auf der TGGE

Bei der Amplifikation von Reinkultur- und Klonsequenzen mit den verschiedenen Primerpaaren fiel auf, daß einige Sequenzen keine distinkten, scharfen Banden auf der TGGE bildeten, sondern eine mehr oder weniger diffuse Schwärzung („Wolke“) darstellten (s. Abb. 9). TGGE-Analysen mit einem senkrechten Temperaturgradienten ergaben, daß diese Sequenzen während des gesamten Temperaturbereiches, in dem die 16S Moleküle unvollständig aufgeschmolzen sind, eine unscharfe, diffuse Schwärzung zeigten. Außerdem wurden diese Amplifikate zeitlich versetzt auf einer TGGE mit einem parallelen Temperaturgradienten aufgetragen, um anhand dieser sog. „Time course“-Analysen (Muyzer *et al.*, 1996) die Elektrophoreseeigenschaften bei verschiedenen Laufzeiten zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß nur ein Teil dieser Sequenzen nach relativ kurzen Laufzeiten (2 h) distinkte Banden bildete, nach längeren Laufzeiten (ab 3 h) jedoch, genau wie die anderen untersuchten Sequenzen, diffuse Schwärzungen bildeten (nicht gezeigt). Da von einigen dieser Kulturen die Sequenz der 16S rDNA bekannt war, und zudem nahe verwandte Sequenzen

vorlagen, die distinkte Banden bildeten, konnte das theoretische Laufverhalten der Sequenzen in einem Temperaturgradientengel anhand der *POLAND*-Software untersucht werden, um Rückschlüsse von der Sequenz auf dieses auffällige Laufverhalten zu erhalten. Für die Berechnungen wurden 6 „wolkenbildene“ und 5 bandenbildene 16S rDNA-Sequenzen naher verwandter Klone aus der Gruppe der  $\beta$ -Proteobakterien (*Rubrivivax*-Gruppe) einbezogen. Eine weitere Klonsequenz dieser Gruppe (ms 65) bildete reproduzierbar eine unscharfe Bande auf der TGGE, die im Unterschied zu einer „Wolkenbildung“ aber noch deutlich als Bande erkennbar war (Abb. 9, Spur 3).

Im Gegensatz zu der Berechnung von „Gel-Plots“ (Darstellung der Temperatur gegen die relative Mobilität der Sequenz, was das Laufverhalten in einem senkrechten Gel simuliert) konnten anhand der Berechnungen von „Temp-Plots“ (Darstellung der einzelnen Basenpaare der Sequenz gegen die Temperatur, bei der mit 50%iger Wahrscheinlichkeit das Basenpaar an der entsprechenden Position aufgeschmolzen ist) Charakteristika ermittelt werden, die spezifisch für die „wolkenbildenen“ Sequenzen waren. Anhand der graphischen Darstellung der Temp-Plots können die als Schmelzdomänen bezeichneten Bereiche von Basenpaaren mit identischer Schmelztemperatur aufgezeigt werden. Sobald die Domäne mit der niedrigsten Schmelztemperatur die entsprechende Temperatur erreicht hat, schmilzt die Sequenz partiell auf, so daß deren Migrationsgeschwindigkeit während der Elektrophorese verringert wird (Muyzer & Smalla, 1998).

In Abb. 10 sind exemplarisch die Temp-Plots einiger Sequenzen dargestellt, die distinkte Banden bzw. „Wolken“ bildeten. Die Sequenz von Klon ms 8 zeigte eine für TGGE-Anwendungen ideale Schmelzkurve, da hier fast alle Basenpaare bei Erreichen einer bestimmten Temperatur gleichzeitig aufschmelzen, was zu einer sehr starken Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit während der Elektrophorese und somit zur Ausbildung von sehr scharfen Banden führt. Aber auch geringfügige Abweichungen von diesem Idealverlauf führten noch zu einer sehr scharfen Bandenbildung (ms 37).

Anhand der Auswertung der Temp-Plots kann die Bildung unspezifischer Banden auf zwei verschiedene Sequenzcharakteristika zurückgeführt werden: Zum einem das Auftreten einer sehr langen (ca. 100 Bp), aber gleichzeitig relativ flachen Schmelzdomäne (ms 35), und zum anderen die Lage einer relativ wenige Basen umfassenden Schmelzdomäne nahe der GC-Klammer (vorkommend bei 5 von 6 „wolkenbildenen“ Sequenzen, beispielhaft s. ms 61 und ms 19). Längere Schmelzdomänen (ca. 65 Bp) nahe der GC-Klammer führten dagegen wieder zur Ausbildung distinkter Banden (ms 34).

Die Berechnung der Temp-Plots ergab ebenfalls, daß bei drei Sequenzen (unter anderem ms 61) zusätzlich eine zweite Schmelzdomäne in der Mitte des Amplifikates auftrat. Alle drei Sequenzen zeigten eine vergleichbare unspezifische Bandenbildung wie Sequenz ms 19, die keine zweite Schmelzdomäne aufwies, so daß hier offensichtlich die Lage der vorderen Schmelzdomäne nahe der GC-Klammer ausschlaggebend für die „Wolkenbildung“ war. Die Sequenz von ms 65 war dadurch gekennzeichnet, daß keine Schmelzdomäne nahe der GC-Klammer vorlag, allerdings eine zu ms 61 vergleichbare Domäne in der Mitte des Amplifikates, was hier zur Bildung einer unscharfen Bande führte. Insofern beeinträchtigte eine solche Schmelzdomäne offensichtlich die Ausbildung distinkter, scharfer Banden; führte allerdings nicht zu einer „Wolkenbildung“.

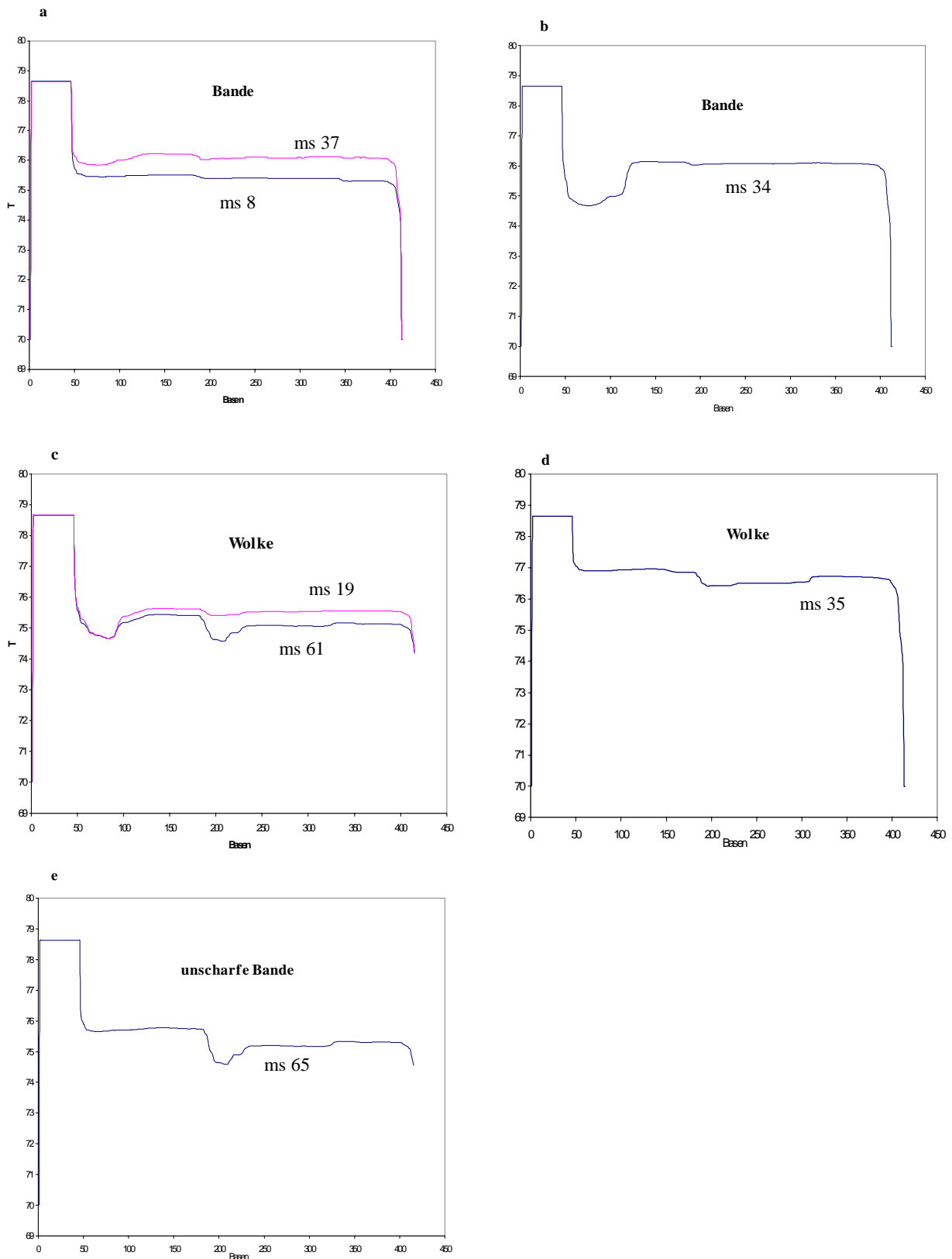


Abb. 10: Darstellung der Temp-Plots einiger nahe verwandter Sequenzen, die nach Amplifikation mit dem Primerpaar F984-GC/R 1346 auf der TGGE unterschiedliche Laufverhalten (distinkte Bande: ms 8 und 37 (a); ms 34 (b); diffuse Schwärzung („Wolke“): ms 19 und 61 (c); ms 35(d); unscharfe Bande: ms 65 (e)) zeigten. Die Berechnung erfolgte anhand der POLAND-Software unter Einbeziehung der Primersequenzen und der GC-Klammer.

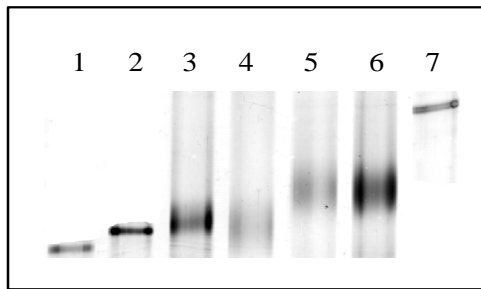


Abb. 9: Darstellung der unterschiedlichen Laufverhalten von 16S rDNA-Klonsequenzen auf der TGGE, die mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 amplifiziert wurden. Anhand von Sequenzanalysen wurden alle Sequenzen in die Rubrivivax-Gruppe der  $\beta$ -Proteobakterien eingeordnet, wobei die als ms 8 (Spur 1), ms 28 (Spur 2) und ms 38 (Spur 7) bezeichneten Klone distinkte Banden auf der TGGE bilden.

Das in Spur 3 aufgetragene Amplifikat von ms 65 zeigt eine unscharfe Bandenbildung, während die Klonsequenzen ms 19, ms 61 und ms 6 (Spur 4-6) diffuse Schwärzungen („Wolken“) auf der TGGE zeigten.

### 3.6 Analyse bakterieller Gemeinschaften

#### 3.6.1 Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft der Rhizoplane der Luzerne

Um die bakterielle Gemeinschaft der Luzerne näher zu charakterisieren, wurde im Rahmen des Verbundprojektes Luzerne in kleinen Mikrokosmen in der Universität Bielefeld angezogen. Aus den Sammelmischproben der Fraktionen Boden, Wurzelboden, Rhizosphäre und Rhizoplane wurden sowohl DNA als auch RNA extrahiert und mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 amplifiziert. Als Wurzelboden wurde hierbei der Boden bezeichnet, der sich nach Entnahme der Pflanzen aus den Mikrokosmen durch sehr kräftiges Schütteln von den Wurzeln ablösen ließ. In Abb. 11 sind die aus der Amplifikation der Nukleinsäuren resultierenden TGGE-Muster aus den verschiedenen Habitaten dargestellt. Anhand des Mustervergleichs zeigte sich, daß sich die jeweiligen bakteriellen Gemeinschaften in den Habitaten Boden, Wurzelboden/Rhizosphäre und Rhizoplane unterschieden. So zeichneten sich im Gegensatz zum Boden in der Rhizoplane fast alle Banden durch eine deutlich höhere Intensität aus, wobei gleichzeitig die Anzahl der Banden abnahm. Die Muster des Wurzelbodens und der Rhizosphäre wiesen untereinander eine größere Ähnlichkeit auf, wobei sie sich stärker von der Rhizoplane als von der Bodenfraktion unterschieden.

Der Vergleich der DNA-Muster mit den RNA-Mustern ergab, daß sich in einem Gradienten vom Boden zur Rhizoplane die Muster immer stärker ähnelten. Während in der Bodenfraktion die im RNA-Muster dominierenden Sequenzen im DNA-Muster häufig unterrepräsentiert waren, war die Übereinstimmung des DNA- mit dem RNA-Muster in der Rhizoplane am größten, da hier viele der im RNA-Muster dominierenden Banden ein identisches Migrationsverhalten zu den im DNA-Muster dominierenden Banden zeigten.



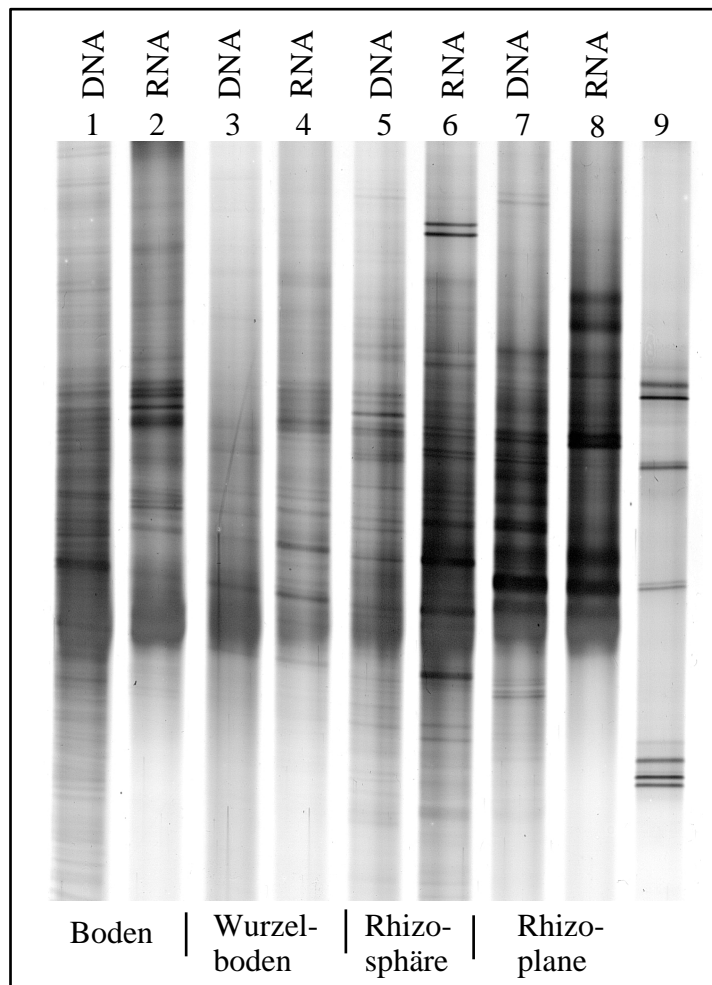


Abb. 11: Vergleich der aus der Amplifikation mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 resultierenden TGGE-Muster der DNA (Spur 1,3,5,7) und RNA (Spur 2,4,6,8) der Fraktionen Boden (Spur 1,2), Wurzelboden (Spur 3,4), Rhizosphäre (Spur 5,6) und Rhizoplane (Spur 7,8) der im Rahmen des Verbundprojektes in der Universität Bielefeld angezogenen Luzernepflanzen. Marker: Spur 9.

Im folgenden wurden die TGGE-Muster der Rhizoplane-Fraktion näher charakterisiert. Hierzu erfolgte zunächst eine Zuordnung von Klonsequenzen aus der von derselben Fraktion angelegten Klonbibliothek (Universität Bielefeld) zu dem TGGE-Bandenmuster (s. Abb. 12).

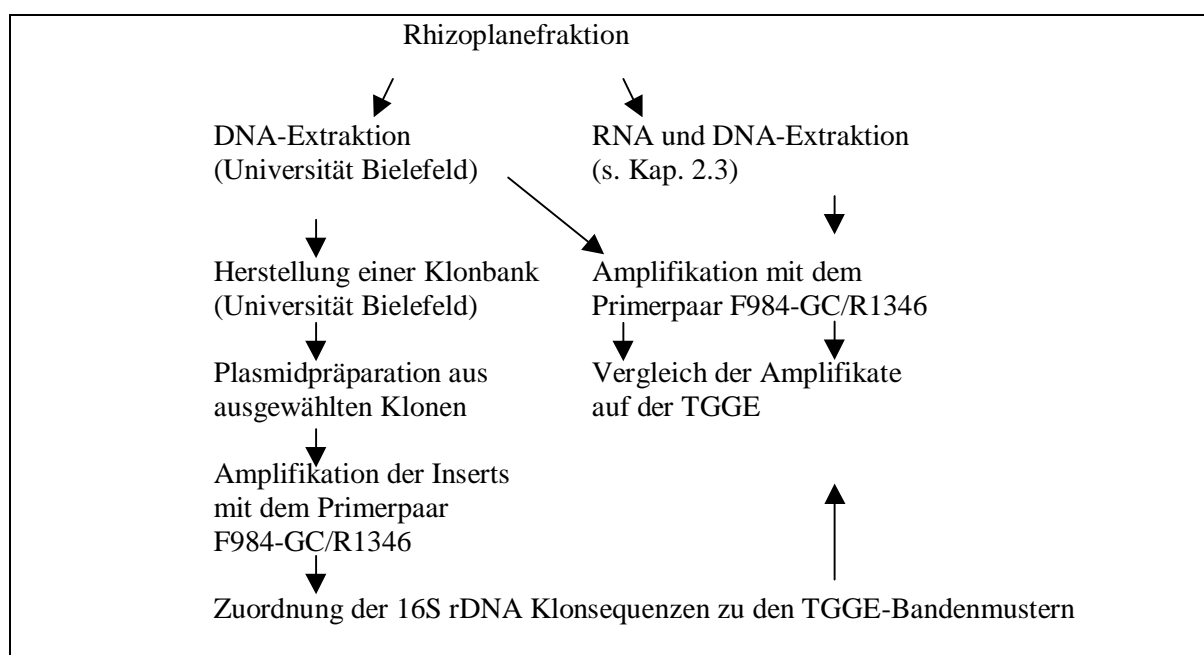


Abb. 12: Schematische Darstellung der Zuordnung von Klonsequenzen zu TGGE Bandenmustern

Für die Herstellung der Klonbank (Universität Bielefeld) wurde ein abweichendes Protokoll zur DNA-Extraktion als in dieser Arbeit verwendet (mod. nach Tsai & Olson, 1991). Deshalb wurden zunächst die DNA-Extrakte, die durch die beiden verschiedenen Methoden gewonnen wurden, nach entsprechender Amplifikation auf der TGGE verglichen, wobei sich nur geringfügige Unterschiede zwischen den Mustern zeigten. Aufgrund dieser hohen Übereinstimmung konnte vermutet werden, daß – unter Vernachlässigung möglicher genereller Fehler bei der Amplifikation bzw. Klonierung – dominierende Sequenzen in der Klonbank dominanten Banden in dem TGGE-Muster zuzuordnen sind. Aus diesem Grund wurden einige der in der Klonbank dominierenden Sequenzen anhand des Migrationsverhaltens mit Banden aus dem Muster der RNA und DNA verglichen. Hierzu wurden von den ausgewählten Klonen, die aufgrund der Sequenzanalyse der 16S rDNA Verwandtschaft zu *Pseudomonas putida* (10 Klone) und zu  $\beta$ -Proteobakterien (15 Klone, verwandt zur *Rubrivia*-, *Variovorax*-, und *Burkholderia*-Gruppe) zeigten, eine Plasmidpräparation durchgeführt und die entsprechenden Amplifikate auf der TGGE aufgetrennt.

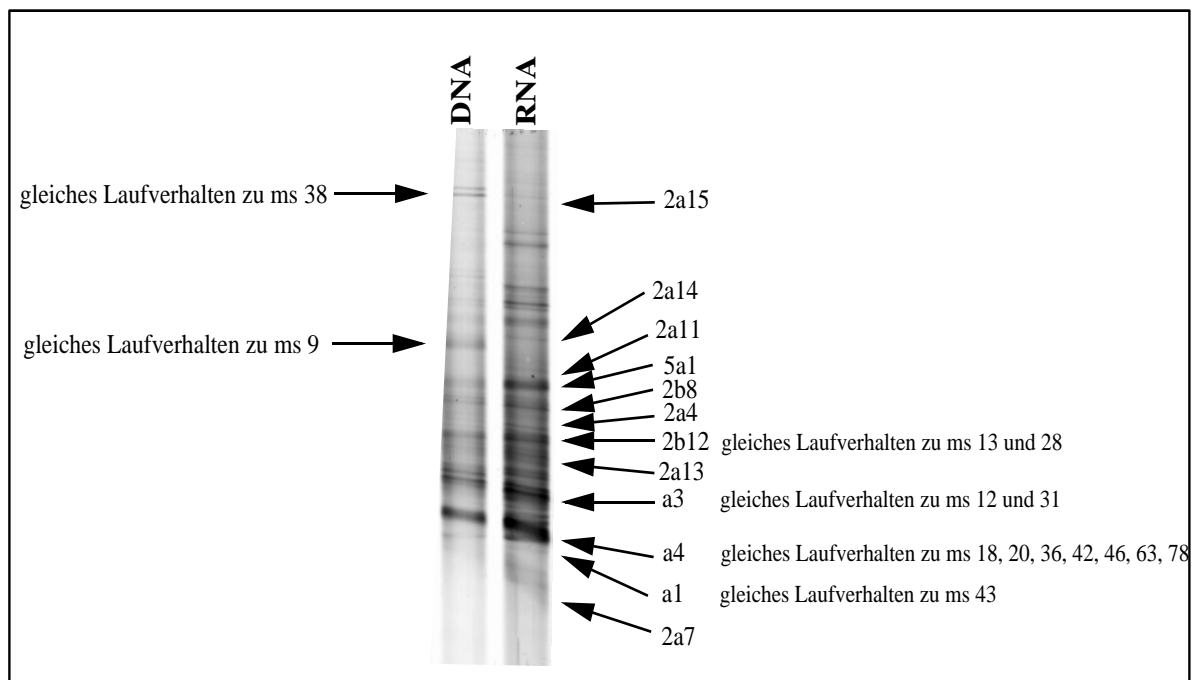


Abb. 13: Zuordnung von Klonsequenzen aus der Klonbibliothek zu Banden aus den aus der Amplifikation der DNA (Spur 1) und RNA (Spur 2) resultierenden TGGE-Bandenmustern der Luzernerhizoplane anhand des Laufverhaltens. Klonsequenzen mit einem identischen Laufverhalten zu Banden aus dem TGGE-Muster sind mit „ms“ bezeichnet. Die Charakterisierung der markierten TGGE-Banden ist Abb. 14 zu entnehmen.

Von den zu den  $\beta$ -Proteobakterien zugeordneten Klonen zeigten zwei Klonsequenzen (ms 38, verwandt zu *Variovorax paradoxus* und ms 9, verwandt zu *Burkholderia pickettii*) ein identisches Migrationsverhalten zu je einer dominanten Bande im DNA-Muster. Im RNA-Muster trat bei der entsprechenden Lauflänge jeweils eine Bande mit nur sehr geringer Intensität auf. Zwei weitere Klonsequenzen (ms 13 und ms 28, Verwandtschaft zu *Variovorax paradoxus*) zeigten ein identisches Migrationsverhalten, in Übereinstimmung mit einer dominanten Bande sowohl im DNA- als auch im RNA-Muster (s. Abb. 13). Bei den anderen, den  $\beta$ -Proteobakterien zugeordneten Se-

quenzen konnten keine weiteren Übereinstimmungen zu den Bandenmustern gefunden werden. Die als *Pseudomonas putida* eingeordneten Klone zeigten unterschiedliche Migrationsverhalten: zwei der untersuchten Klonsequenzen liefen auf derselben Höhe wie die als a3 bezeichnete Bande im TGGE-Muster, 7 Klonsequenzen liefen auf derselben Höhe wie Bande a4 und eine Klonsequenz zeigte ein identisches Migrationsverhalten zu Bande a1 (s. Abb. 13). Diese drei Banden (a1, a3 und a4) waren charakteristisch für die Fraktion der Rhizoplane und dominierten sowohl im RNA- als auch im DNA-Muster der TGGE (vgl. auch Abb. 11). Eine densitometrische Auswertung, bei der die Gesamt-OD aller Banden als 100% gesetzt wurde, ergab, daß diese drei Banden zusammen einem relativen Anteil von 17,3% im RNA-TGGE-Muster entsprachen.

Um eine Zuordnung der Klonsequenzen der Universität Bielefeld zu dem Bandenmuster nicht nur aufgrund des Vergleichs des Laufverhaltens durchzuführen, wurden zusätzlich von zwei Klonsequenzen (ms 28 und ms 46) modifizierte V6-Sonden hergestellt und mit den Bandenmustern hybridisiert. Die 16S rDNA-Sequenzen der beiden Klone zeigten je ein identisches Migrationsverhalten zu dominanten Banden im RNA-bzw. DNA-TGGE-Muster (Bande 2b12/Klon ms 28, verwandt zu *Variovorax paradoxus* und Bande a4/ms 46, verwandt zu *Pseudomonas putida*, Abb. 13). Um die im folgenden beschriebenen Übereinstimmungen zu verifizieren, wurden die entsprechenden Banden anschließend aus dem TGGE-Muster eluiert und sequenziert.

Die von der Klonsequenz ms 28 hergestellte Sonde hybridisierte nur mit derjenigen Bande im DNA bzw. RNA-Muster, die dasselbe Laufverhalten wie ms 28 zeigte (Bande 2b12, Abb. 13). Die zu ms 28 nahe verwandte Klonsequenz ms 13 hatte allerdings eine identische V6-Region und zeigte – wie oben beschrieben – ebenfalls ein identisches Migrationsverhalten. Insofern konnte mit dieser Methodik keine exakte Zuordnung der Bande 2b12 zu einer Klonsequenz erfolgen. Die anschließende Sequenzanalyse der Bande 2b12 ergab jedoch eine vollständige Übereinstimmung der Partialsequenz zu Klon ms 13.

Die von der Klonsequenz ms 46 hergestellte Sonde hybridisierte neben der Bande a4 des TGGE-Musters der DNA und RNA, die ein identisches Laufverhalten zu ms 46 zeigte, noch mit zwei weiteren Banden des TGGE-Musters (a1 und a3). Diese drei Banden a1, a3 und a4 wurden eluiert und sequenziert und zeigten eine Homologie von 100% in der V6-Region (vgl. Kap. 3.4). Die Partialsequenzanalyse der V6-V8-Region der drei Banden ergab eine hohe Ähnlichkeit untereinander und ebenfalls eine Zuordnung zu *P. putida*.

Um zu ermitteln, ob diese drei untereinander sehr ähnlichen *P. putida*-Sequenzen, die sowohl im TGGE-Muster als auch in der Klonbibliothek dominierten, ursprünglich aus verschiedenen oder gleichen Organismen dieses Habitates stammten und somit eine Sequenzheterogenität vorliegt, wurden zwei von R. Pukall zur Verfügung gestellte Isolate auf der TGGE untersucht. Die Isolate stammten aus der Rhizoplane derselben Probenahme im Rahmen dieses Verbundprojektes und wurden anhand von ARDRA- und Sequenzanalysen ebenfalls als *P. putida*-verwandte Sequenzen eingeordnet (R. Pukall, persönliche Mitteilung). Nach Amplifikation der 16S rDNA der Rein-kulturen bildeten beide Isolate auf der TGGE ein Muster von je drei Banden, die ein übereinstimmendes Laufverhalten zu den Banden a1, a3 und a4 des TGGE-Bandenmusters zeigten. Dies deutet auf eine Sequenzheterogenität in der 16S rDNA dieser Bakterien hin.

Ein Vergleich der relativen Bandenintensität dieser drei Sequenzvarianten im RNA- und DNA-Muster und auch in dem aus den Isolaten resultierenden DNA-Muster zeigte übereinstimmend, daß

in allen drei Mustern die zu a4 korrespondierende Sequenz die stärkste Intensität aufwies, gefolgt von der zur Bande a3 entsprechenden Sequenz. Die zu a1 entsprechende Sequenz war in allen Mustern deutlich schwächer ausgeprägt. Die relative Häufigkeit dieser Sequenzvarianten spiegelte sich auch in den untersuchten *P. putida*-Klonen wider, da die Anzahl der jeweiligen Klonsequenzen mit der Intensität der entsprechenden Banden innerhalb des TGGE-Musters korrelierte.

Da sich die aus der Fraktion der Rhizoplane resultierenden TGGE-Muster der DNA- und RNA stark ähnelten, wurden für eine weitere Charakterisierung des Musters nur aus dem RNA-Muster weitere Banden eluiert, kloniert und mittels der TGGE die entsprechenden Klonsequenzen gescreent. Das Ergebnis der Partialsequenzanalyse und der tendenziellen phylogenetischen Einordnung ist in Abb. 14 dargestellt.

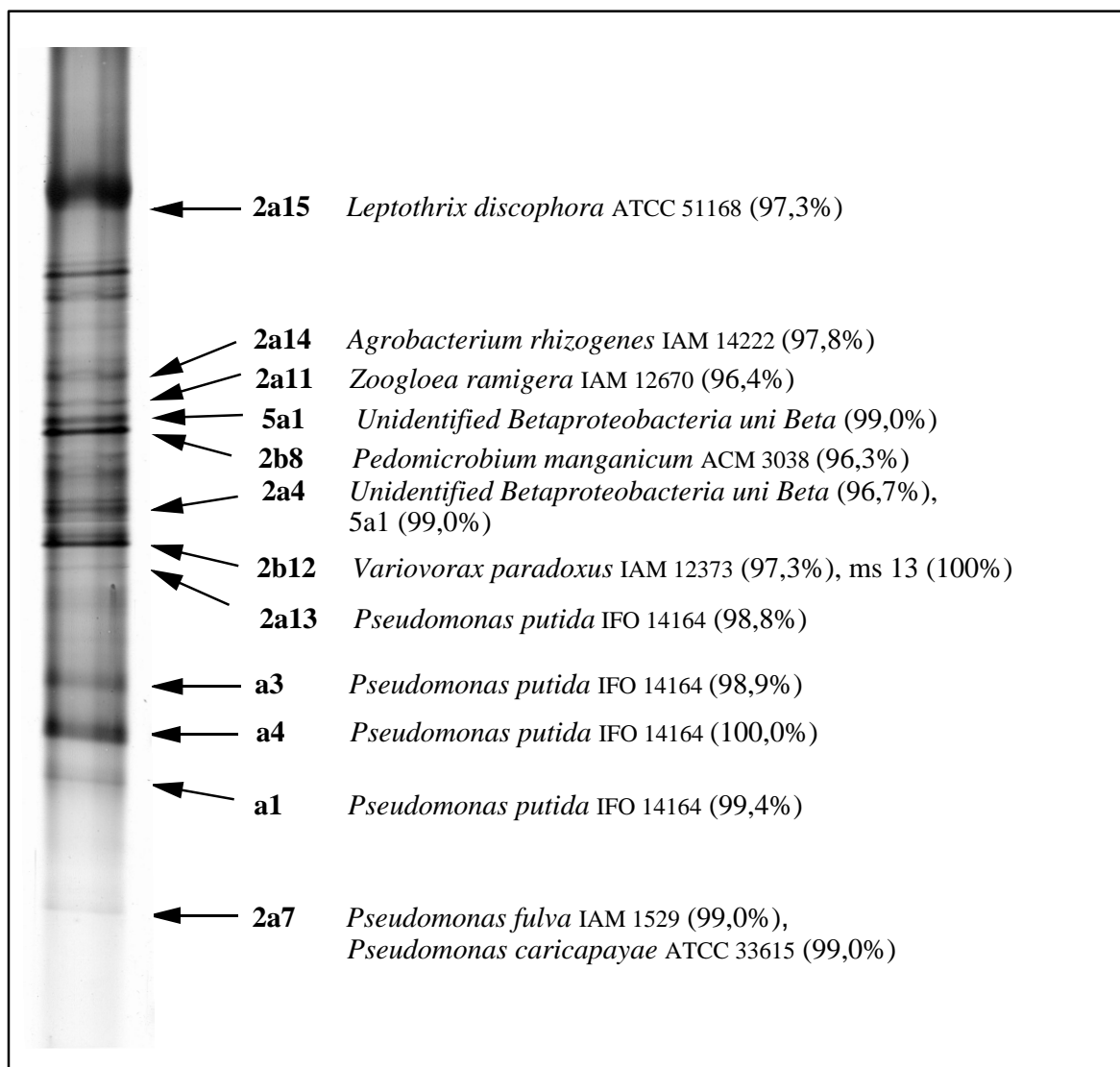


Abb. 14: Analyse der partiellen 16S rRNA Sequenzen von eluierten Banden aus dem RNA-TGGE-Bandenmuster der Rhizoplane der Luzerne mit Angabe der Ähnlichkeiten zu verwandten Datenbankreferenzen.

### 3.6.2 Charakterisierung der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaften der Luzerne durch eine Inokulation mit dem *S. meliloti* Wildtypstamm 2011 und dem gentechnisch veränderten Stamm L33

Aufbauend auf dem in Kap. 3.6.1 beschriebenen Versuchsansatz wurde im folgenden Jahr Luzerne im Rahmen des Verbundprojektes erneut unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen in der GSF Neuherberg angezogen. Zusätzlich erfolgte eine Inokulation mit dem *S. meliloti* Wildtypstamm 2011 und dem gentechnisch veränderten Stamm L33. In Form von Sammelmischproben wurden von jeder Versuchsvariante (Kontrolle, inokuliert mit WT 2011 und L33) sowohl RNA als auch DNA aus den Fraktionen Boden, Rhizosphäre und Rhizoplane extrahiert, mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 amplifiziert und auf der TGGE aufgetrennt (beispielhaft für die RNA-TGGE-Muster s. Abb. 15). Anhand des Vergleichs der daraus resultierenden TGGE-Muster zeigte sich, daß in der Bodenfraktion weder im DNA- noch im RNA-Muster ein Effekt durch eine Inokulation sichtbar war. Das gleiche galt für das DNA-Muster der Rhizosphäre. Im RNA-Muster der Rhizosphäre trat dagegen in dem nicht inokulierten Kontrollansatz eine Bande auf, für die es keine Entsprechung in den inokulierten Ansätzen gab (Abb. 15, 16). Die Partialsequenzanalyse dieser Bande ergab eine Ähnlichkeit von 98,5% zu *Cylindrospermum sp.* (s. Abb. 16).

In der Fraktion der Rhizoplane traten sowohl im RNA- als auch im DNA-Muster der inokulierten Ansätze je zwei stark dominierende Banden auf, die in den TGGE-Mustern der Kontrollansätze nicht (DNA-Muster) oder nur sehr schwach (RNA-Muster) auftraten (s. Abb. 15 und Abb. 16 Bande J12 und R34). Eine Sequenzanalyse dieser Banden ergab eine Ähnlichkeit von 99,7% (Bande J12) bzw. 100% (Bande R34) zu *S. meliloti*. Die mit demselben Primerpaar amplifizierte 16S rDNA einer Reinkultur des inokulierten Wildtypstammes 2011 zeigte auf der TGGE ebenfalls zwei Banden mit einem entsprechenden Migrationsverhalten zu den beiden dominanten Banden im Rhizoplanemuster (Abb. 15, Spur 10), was auf das Vorliegen einer Sequenzheterogenität in den 16S rRNA-Genen der inokulierten *S. meliloti*-Stämme hindeutet.

Außer diesen beiden Banden, die direkt auf den inokulierten Stamm zurückzuführen waren, konnten keine weiteren durch eine Inokulation bedingten Veränderungen der TGGE-Muster aufgezeigt werden.

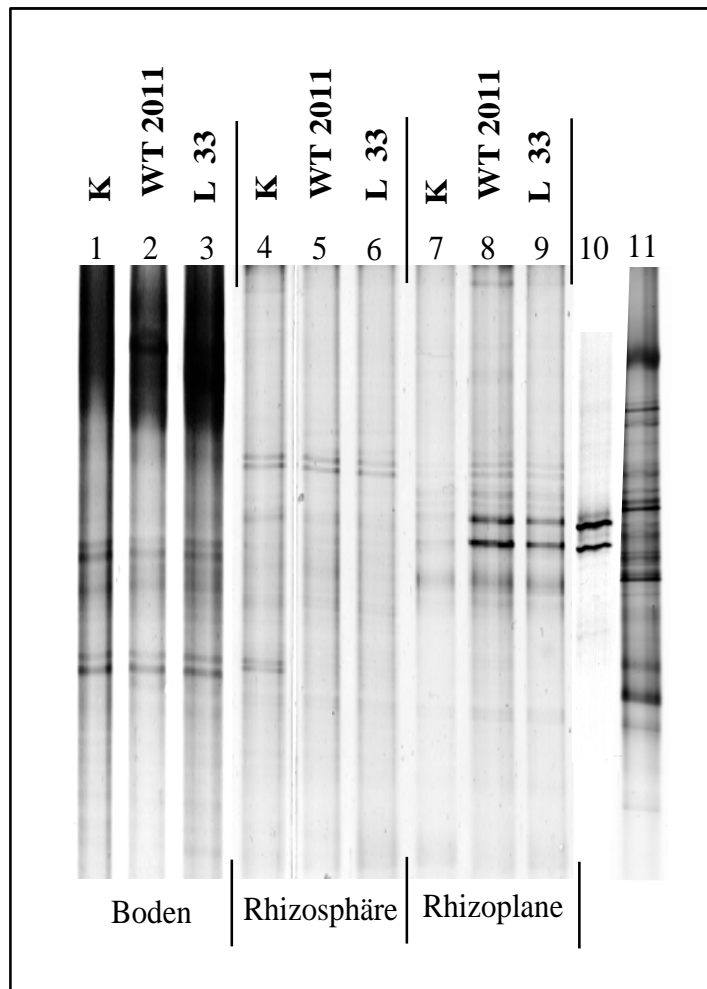


Abb. 15: Einfluß einer Inokulation mit dem *S. meliloti* Wildtyp-Stamm („WT 2011“) und dem gentechnisch veränderten Stamm („L33“) auf die aus der Amplifikation der 16S rRNA mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 resultierenden TGGE-Muster im Vergleich zu einer nicht-inokulierten Kontrolle („K“) der Fraktionen Boden (Spur 1-3), Rhizosphäre (Spur 4-6) und Rhizoplane (Spur 7-9). Als Vergleich ist das aus der Amplifikation der 16S rRNA resultierende Bandenmuster der Luzernerhizoplane aus der Verbundprojektprobenahme des vorherigen Jahres in Spur 11 dargestellt. In Spur 10 ist das aus der Amplifikation der DNA mit demselben Primerpaar resultierende PCR-Produkt einer Reinkultur von *S. meliloti* WT 2011 aufgetragen.

Wie in dem vorherigen Versuchsansatz zeigte sich auch hier in der Fraktion der Rhizoplane eine hohe Übereinstimmung zwischen den TGGE-Mustern der RNA und der DNA. Durch Elution und Sequenzierung weiterer Banden wurde das RNA-TGGE-Muster der Rhizoplane näher charakterisiert (s. Abb. 16).

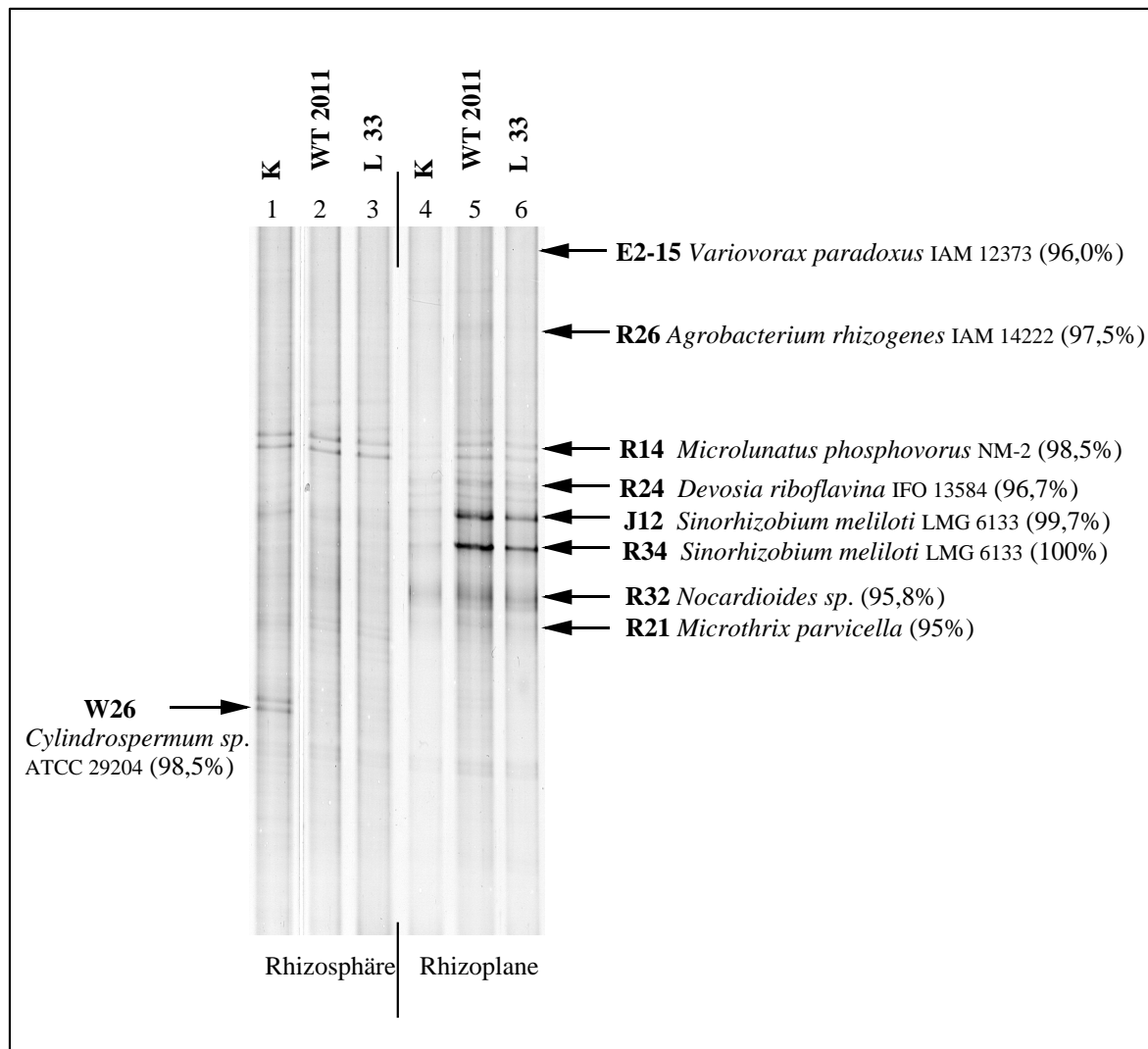


Abb. 16: Analyse der partiellen 16S rRNA Sequenzen von eluierten Banden aus dem RNA-TGGE-Bandenmuster der Rhizosphäre (Spur 1-3) und Rhizoplane (Spur 4-6) der Luzerne mit Angabe der Ähnlichkeiten zu verwandten Datenbankreferenzen. Dargestellt sind die aus der Amplifikation der 16S rRNA mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 resultierenden TGGE-Muster der Luzerne nach einer Inokulation mit dem *S. meliloti* Wildtyp-Stamm („WT 2011“) und dem gentechnisch veränderten Stamm („L33“) im Vergleich zu einer nicht-inokulierten Kontrolle („K“).

Bei einigen der in diesem Verbundprojekt isolierten Reinkulturen aus der Rhizoplane (DSMZ Braunschweig) ergaben sich Hinweise, daß sie in unterschiedlichen Häufigkeiten in den verschiedenen Inokulationsansätzen auftraten. Diese Reinkulturen wurden anhand der Partialsequenzanalyse zu *Duganella zoogloeoides* und *Variovorax paradoxus* (jeweils zwei Isolate) eingeordnet

(A. Götz, persönliche Mitteilung) und auf der TGGE anhand ihres Laufverhaltens mit den aus der RNA und DNA resultierenden Bandenmustern der Rhizoplane verglichen. Nur das Amplifikat einer Reinkultur von *Variovorax paradoxus* zeigte hierbei ein identisches Migrationsverhalten zu einer stärkeren Bande im TGGE-Muster (Bande E2-15, s. Abb. 16), zwei andere Reinkulturamplifikate zeigten ein übereinstimmendes Laufverhalten zu nur sehr schwach ausgeprägten Banden im Muster und für ein Amplifikat konnte keine entsprechende Bande ermittelt werden. Die den Reinkulturen entsprechenden Banden im TGGE-Muster zeigten allerdings in den verschiedenen Inokulationsansätzen jeweils eine gleiche Intensität, so daß hier keine Beeinflussung aufgezeigt werden konnte.

In Spur 11 der Abbildung 15 ist das RNA-TGGE-Muster der Rhizoplane der Luzerne aus dem vorherigem Jahr (s. Kap. 3.6.1) als Vergleich aufgetragen. Dieses TGGE-Muster unterschied sich deutlich von dem aus dem nicht-inokulierten Kontrollansatz resultierenden RNA-TGGE-Muster (Spur 7). Dies zeigte sich ebenfalls in den entsprechenden DNA-Mustern und auch in der Sequenzanalyse der in den jeweiligen Mustern dominierenden Banden (vgl. Abb. 14): Während im Jahr zuvor im RNA-Muster der Rhizoplane *Variovorax*-verwandte Sequenzen und weitere  $\beta$ -Proteobakterien sowie Sequenzen aus der *Rhizobium-Agrobacterium* Gruppe vorkamen und vor allem *P. putida* stark dominant war, konnte im folgenden Jahr die Dominanz dieser Sequenzen nicht bestätigt werden. Auffällig war in dieser Probenahme die relativ hohe Anzahl von Banden mit Verwandtschaft zu Sequenzen von Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt (Bande R14, R32 und R21).

Eine ansatzweise Übereinstimmung konnte nur anhand einer zu *Agrobacterium rhizogenes*-verwandten Sequenz aufgezeigt werden, die in beiden Jahren im RNA-Muster auftrat: die Sequenz der Bande R26 zeigte eine relativ hohe Ähnlichkeit (99,3%) zu der im Vorjahr ermittelten Sequenz 2a14. Allerdings zeigten diese beiden Sequenzen auf der TGGE ein unterschiedliches Laufverhalten, so daß es sich hierbei um verschiedene Stämme handelte.

Um zu ermitteln, ob die in diesem Versuchsansatz durchgeführte Inokulation zu einer Beeinflussung von Sinorhizobien-verwandten Sequenzen führte, wurden die RNA-Extrakte der Rhizoplanefraktion mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 amplifiziert und auf der TGGE aufgetrennt. Die Verwendung des spezifischen Primers R1463 führte zu einer Verringerung der Bandenanzahl im Muster (Abb. 17a). Um die erhaltenen Bandenmuster näher zu analysieren, wurde ein Teil der aufgetrennten Sequenzen eluiert und sequenziert. Die Ergebnisse der Partialsequenzanalyse der entsprechenden Banden sind in Abb. 17 dargestellt. Hierbei zeigten alle anhand der Datenbanken ermittelten nächsten verwandten Sequenzen eine Zugehörigkeit zu der *Rhizobium-Agrobacterium* Gruppe der  $\alpha$ -Proteobakterien, wobei allerdings *Rhizobium mongolense* in der RDP-Datenbank nicht hinterlegt war, so daß hier keine Einordnung erfolgen konnte.



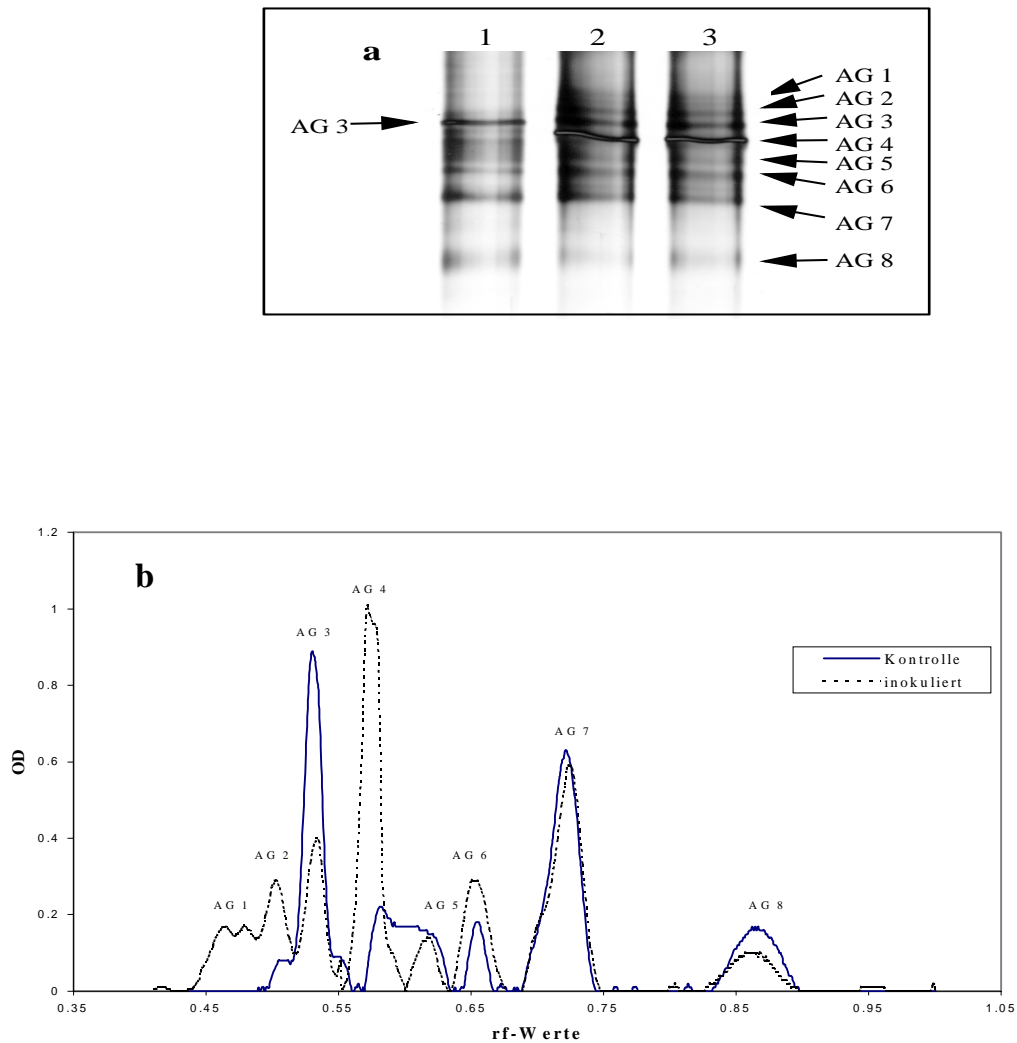


Abb 17: Einfluß einer Inokulation von *Sinorhizobium meliloti* auf die aus der Amplifikation der 16S rRNA mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 resultierenden TGGE-Bandenmuster der Luzernerhizoplane. In [a] sind die TGGE-Muster aus dem mit *S. meliloti* WT 2011 (Spur 2) und L33 (Spur 3) inokulierten Versuchsansatz im Vergleich zu der nicht-inokulierten Kontrolle (Spur 1) dargestellt, sowie die aus diesen Bandenmustern eluierten und sequenzierten Banden. [b] zeigt die graphische Darstellung der Bandenintensitäten anhand der OD-Werte nach Digitalisierung der in [a] dargestellten TGGE-Muster mittels der *Diversity Database*-Software. Da keine Unterschiede zwischen den TGGE-Mustern der beiden inokulierten Ansätze auftraten, wurden die entsprechenden Intensitäten dieser Bandenmuster (Spur 2+3) gemittelt und gegen die RF-Werte dargestellt. Die Analyse der partiellen 16S rRNA Sequenzen der eluierten Banden ergab folgende Ähnlichkeiten zu verwandten Datenbankreferenzen:

- AG 1: *Sinorhizobium meliloti* LMG 6133 (98,8%)
- AG 2: *Sinorhizobium meliloti* LMG 6133 (99,4%)
- AG 3: *Rhizobium leguminosarum* IAM 12609 (98,5%)
- AG 4: *Sinorhizobium meliloti* LMG 6133 (100%)
- AG 5: *Bartonella elizabethae* ATCC 49927 (96,8%)
- AG 6: *Rhizobium giardinii* (97,9%)
- AG 7: *Rhizobium mongolense* (99,4%)
- AG 8: *Rhizobium huakuii* IAM 14158 (93,7%)

Der Vergleich der TGGE-Muster der verschiedenen Inokulationsvarianten zeigte, daß in dem nicht-inokulierten Kontrollansatz die als AG 3 bezeichnete Bande (Ähnlichkeit zu *Rhizobium leguminosarum* 98,5%) dominierte, wobei diese Bande in beiden inokulierten Ansätzen schwächer ausgeprägt war. In diesen Ansätzen dominierte die Sequenz der jeweils inokulierten *S. meliloti*-Stämme (AG 4), gekennzeichnet durch eine Partialsequenzhomologie von 100% zu *S. meliloti* und einem identischen Migrationsverhalten zu dem inokulierten Wildtypstamm 2011. Die in Abb. 17b gezeigte Darstellung der entsprechenden OD-Werte verdeutlicht die jeweiligen Unterschiede in den Bandenintensitäten.

Anhand der TGGE-Mustervergleiche zeigte sich, daß im Gegensatz zu der Verwendung des universellen Primers R1346 bei der Anwendung des spezifischen Primers R1463 eine Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation aufzeigbar war, die sich nicht nur in dem zusätzlichen Auftreten der inokulierten *S. meliloti*-Sequenz (AG 4) in den entsprechenden Ansätzen äußerte: Die in dem Kontrollansatz dominierende Sequenz AG 3 (Verwandt zu *R. leguminosarum*) wurde durch eine Inokulation deutlich in ihrer relativen Stärke reduziert; zudem wiesen die beiden zu *S. meliloti*-verwandten Sequenzen AG 1 und AG 2 in den TGGE-Mustern der inokulierten Ansätze eine größere Intensität auf.

Die TGGE-Muster aus den beiden inokulierten Ansätzen (inokuliert mit *S. meliloti* WT 2011 und L33) unterschieden sich untereinander weder bei der Verwendung des Primers 1346, noch bei dem spezifischen Primer R1463.

### **3.6.3 Untersuchung des Ausmaßes der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation mit *S. meliloti* L33 an der Wirtspflanze Luzerne im Vergleich zu Roggen in verschiedenen Bodentypen**

Die in diesem Versuch angezogenen Luzerne- und Roggenpflanzen wurden in zwei verschiedenen Bodentypen (FAL- und STM-Boden) in großen Mikrokosmen kultiviert. Jeweils die Hälfte der Mikrokosmen wurde mit *S. meliloti* L33 inokuliert. Die Ergebnisse der in diesem Versuchsansatz von R. Miethling durchgeführten Untersuchungen zur Wurzelnodulation sind in Tab. 5a dargestellt. Bei der Probenahme wurde aus jedem Mikrokosmos je eine Fraktion Boden, Rhizosphäre und Rhizoplane aufgearbeitet. Aufgrund der hohen Probenanzahl wurden bei den Roggenmikrokosmen anschließend die Fraktionen von je zwei der vier unabhängigen Wiederholungen vereint, die entsprechenden Fraktionen der Luzernemikrokosmen wurden allerdings separat analysiert. Aus jeder Fraktion erfolgte eine Ribosomenisolierung und parallele DNA-Extraktion, wobei die Nukleinsäuren anschließend mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 amplifiziert und auf der TGGE aufgetrennt wurden.

Die daraus resultierenden TGGE-Muster sowohl der RNA als auch der DNA zeigten bei allen Ansätzen jeweils eine sehr hohe Ähnlichkeit innerhalb der unabhängigen Wiederholungen (s. Abb. 18).

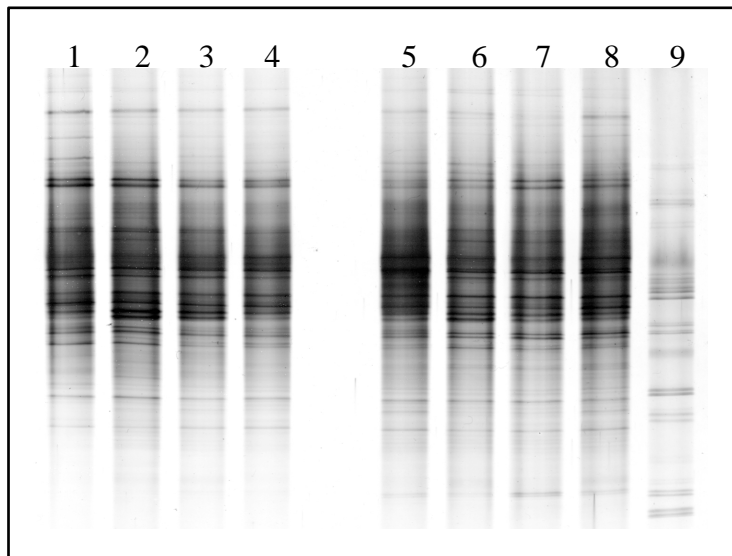


Abb. 18: Darstellung der Kongruenz der aus der Amplifikation von RNA-Extrakten der vier unabhängigen Wiederholungen einer Versuchsvariante resultierenden TGGE-Muster. Dargestellt sind die Amplifikate aus der Rhizosphäre der Luzerne im FAL-Bodentyp, nicht inokuliert (Spur 1-4) und inokuliert mit L 33 (Spur 5-8). Spur 9: Marker.

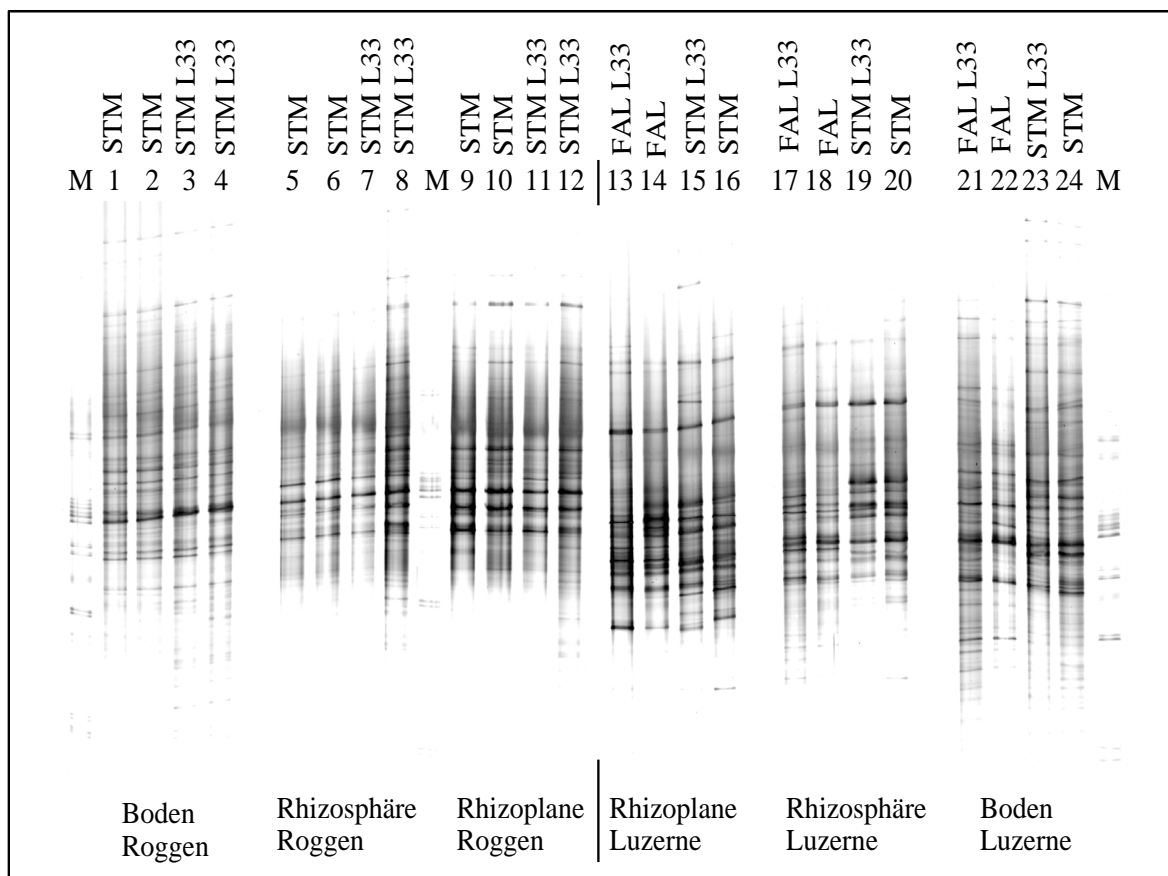


Abb. 19: Vergleich der aus der Amplifikation der RNA resultierenden TGGE-Muster der verschiedenen Versuchsvarianten. (Zusammenstellung aus zwei verschiedene Gelen, Gel 1: bis Spur 12, Gel 2: ab Spur 13.) Dargestellt sind jeweils die beiden unabhängigen Wiederholungen der Roggenpflanzen im STM-Boden (Spur 1-12) und je eine der vier unabhängigen Wiederholungen jeder Versuchsvariante der Luzerne (Spur 13-24) in den Habitaten Boden (Spur 1-4 und 21-24), Rhizosphäre (Spur 5-8 und 17-20) und Rhizoplane (Spur 9-12 und 13-16). Die verschiedenen Varianten sind durch folgende Abkürzungen gekennzeichnet: FAL: FAL-Bodentyp, STM: STM-Bodentyp, L33: inokuliert mit *S. meliloti* L33, M: Marker.

In Abb. 19 sind beispielhaft je ein bzw. zwei RNA-TGGE-Muster der unabhängigen Wiederholungen der unterschiedlichen Versuchsvarianten dargestellt. Vor allem die Muster der Bodenfraktionen waren durch das Auftreten sehr vieler Banden mit geringer Intensität charakterisiert, wobei dies noch deutlicher in den entsprechenden DNA-Mustern zu erkennen war (Abb. 20). Die Muster der Rhizoplane zeichneten sich dagegen durch ein differenzierteres Muster, d.h. durch mehrere Banden mit stärkerer Intensität, aus (Abb. 19, 20). In Abb. 20 wird ebenfalls deutlich, daß – in Übereinstimmung mit den in Kap. 3.6.1 beschriebenen Ergebnissen – sich auch hier die RNA-Muster im Vergleich zu den DNA-Mustern vom Boden zur Rhizoplane hin immer stärker ähnelten. Diese Tendenzen waren bei allen hier untersuchten Luzernevarianten in den verschiedenen Bodentypen (Kap. 3.6.1.-3.6.4) aufzeigbar, ebenso wie bei den anderen Pflanzen Roggen, Bohne und Klee (s. Kap. 3.6.4).

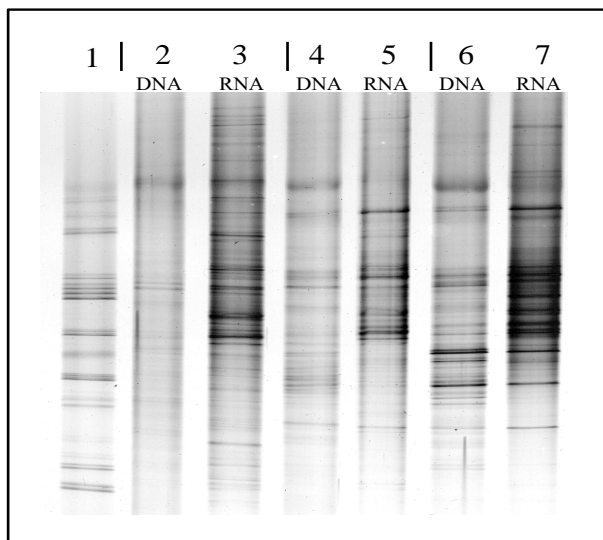


Abb. 20: Vergleich der aus der Amplifikation der RNA und DNA stammenden TGGE-Muster in den verschiedenen Habitaten Boden (Spur 2 und 3), Rhizosphäre (Spur 4 und 5) und Rhizoplane (Spur 6 und 7) der Luzerne im STM-Boden. Die jeweiligen DNA- und RNA-Extrakte eines Habitates wurden innerhalb einer Extraktion aus denselben Mikrokosmen gewonnen. Die DNA-Muster sind in Spur 2, 4 und 6, die entsprechenden RNA-Muster in Spur 3, 5 und 7 dargestellt. Spur 1: Marker.

Ein Vergleich der aus den unterschiedlichen Versuchsvarianten resultierenden TGGE-Muster sowohl der DNA als auch der RNA ergab, daß sich die Muster aus den Roggenmikrokosmen in allen Habitaten deutlich von denen der Luzerne unterschieden (beispielhaft für den STM-Boden in Abb. 19 dargestellt).

Die Unterschiede zwischen den beiden Bodentypen FAL und STM waren bei beiden Pflanzenarten am deutlichsten in der Bodenfraktion zu erkennen. In Abb. 21 ist das resultierende RNA-TGGE-Muster der Bodenfraktion der Luzerne im STM- und FAL-Bodentyp dargestellt, wobei die Unterschiede je nach Bodentyp deutlich hervortreten. Dagegen waren in der Rhizoplane die durch den Bodentyp bedingten Unterschiede geringer ausgeprägt (Abb. 19).

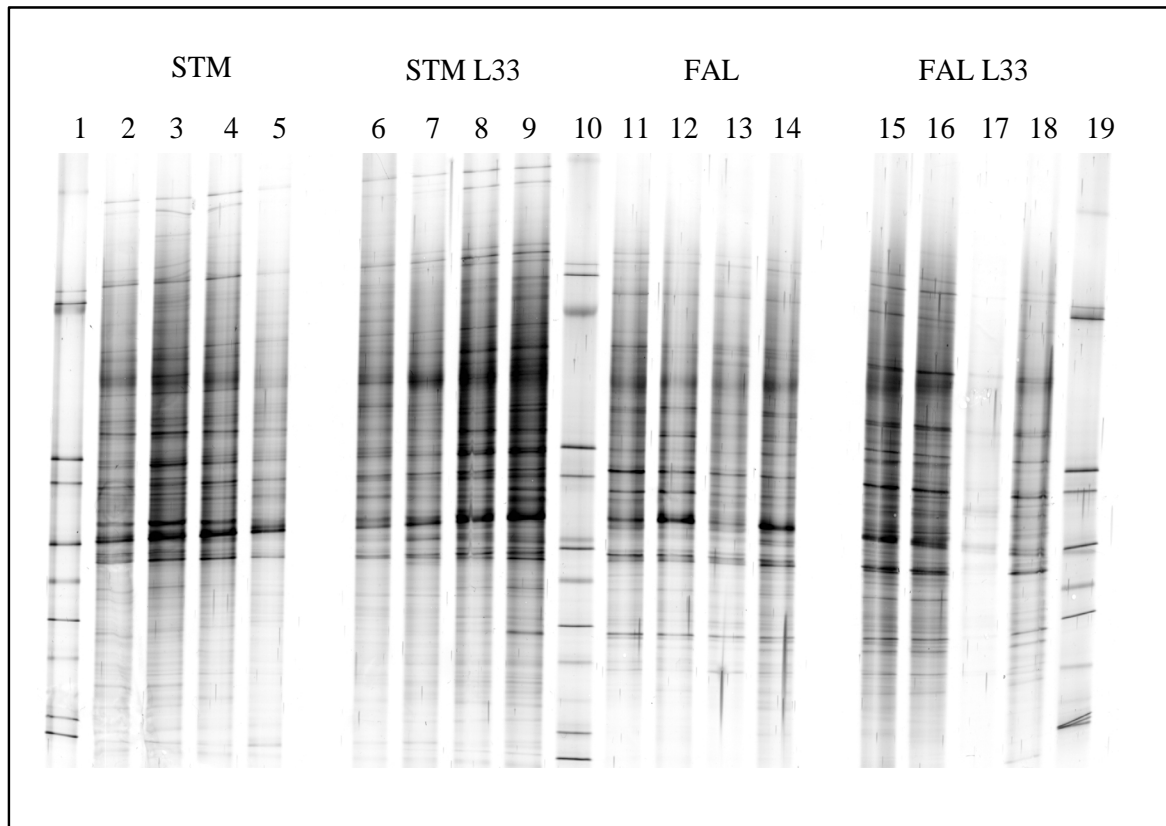


Abb. 21: Darstellung des Einflusses des Bodentyps auf die TGGE-Muster. Aufgetragen sind die amplifizierten RNA-Extrakte der Bodenhabitats aus den mit Luzerne bepflanzt Mikrokosmen, jeweils in vier unabhängigen Wiederholungen. Die Pflanzen wurden im STM-Boden (Spur 2-9) und im FAL-Boden (Spur 11-18) angezogen. Die aus den mit L33 inokulierten Mikrokosmen resultierenden TGGE-Muster sind in Spur 6-9 und 15-18, die nicht-inokulierten Ansätze sind in Spur 2-5 und 11-14 dargestellt. Spur 1, 10, 19: Marker.

Die TGGE-Muster aus den mit L33 inokulierten Mikrokosmen wiesen im Vergleich zu denen aus den nicht-inokulierten Mikrokosmen nur geringfügige Unterschiede auf. Diese zeigten sich in den Luzernehabitats vor allem in Intensitätsunterschieden einiger Banden mit identischem Migrationsverhalten (beispielhaft für die Rhizoplane s. Abb. 22). Insofern ist anzunehmen, daß hier eine Inokulation wahrscheinlich zu einer Beeinflussung von mehreren Vertretern der bakteriellen Gemeinschaft führte. In den TGGE-Mustern der Roggenhabitats waren dagegen die Unterschiede in den parallelen Ansätzen größer als die zwischen den verschiedenen inokulierten Ansätzen (s. beispielhaft für den STM-Bodentyp Abb. 19, Spur 1-12). Um zu untersuchen, ob einige der Veränderungen in den Luzernemustern möglicherweise direkt auf den inokulierten Stamm zurückzuführen waren, wurden 16S rDNA-Amplifikate einer Reinkultur von *S. meliloti* ebenfalls auf den entsprechenden TGGE-Gelen aufgetrennt. Dabei zeigte sich, daß nur in der Rhizoplane-fraktion des FAL-Bodentyps zwei der Banden, die in den inokulierten Ansätzen eine höhere Intensität aufwiesen, ein identisches Migrationsverhalten zu *S. meliloti* aufwiesen (s. Abb. 22).

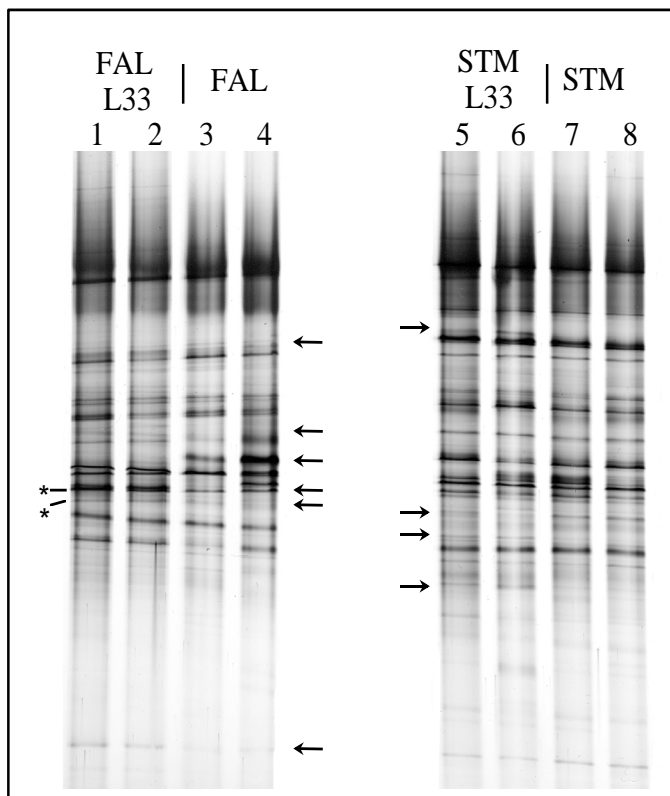


Abb. 22: Darstellung der durch eine Inokulation mit *S. meliloti* L33 hervorgerufenen Unterschiede in den RNA-TGGE-Mustern der Rhizoplane der Luzerne. Aufgetragen sind je zwei der vier unabhängigen Wiederholungen. Die Pflanzen wurden im FAL-Boden (Spur 1-4) und im STM-Boden (Spur 5-8) angezogen. Die Amplifikate aus den inokulierten Varianten sind in Spur 1,2 und 5,6 aufgetragen. Veränderungen in den Bandenmustern durch eine Inokulation im Vergleich zu den nicht inokulierten Varianten (Spur 3,4 und 7,8) sind durch Pfeile markiert. Die Sterne (\*) markieren die Laufhöhe einer Reinkultur von *S. meliloti* WT 2011.

Aufgrund der großen Anzahl der aus den verschiedenen Versuchsvarianten resultierenden TGGE-Muster eines Habitates war eine Abschätzung der Größenordnung der Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Mustern nur schwer möglich. Aus diesem Grund wurden die Muster mit dem in Kap. 3.3 beschriebenen Dokumentationsverfahren ausgewertet und die Ähnlichkeit der Muster anhand von Clusteranalysen ermittelt (Abb. 23, 24). Hierbei wurden Nukleinsäureextrakte, die aufgrund einer fehlerhaften Aufarbeitung kein oder nur ein sehr unzureichendes Amplifikat ergaben (z.B. Abb. 21, Spur 17), nicht in die Clusteranalyse mit einbezogen.

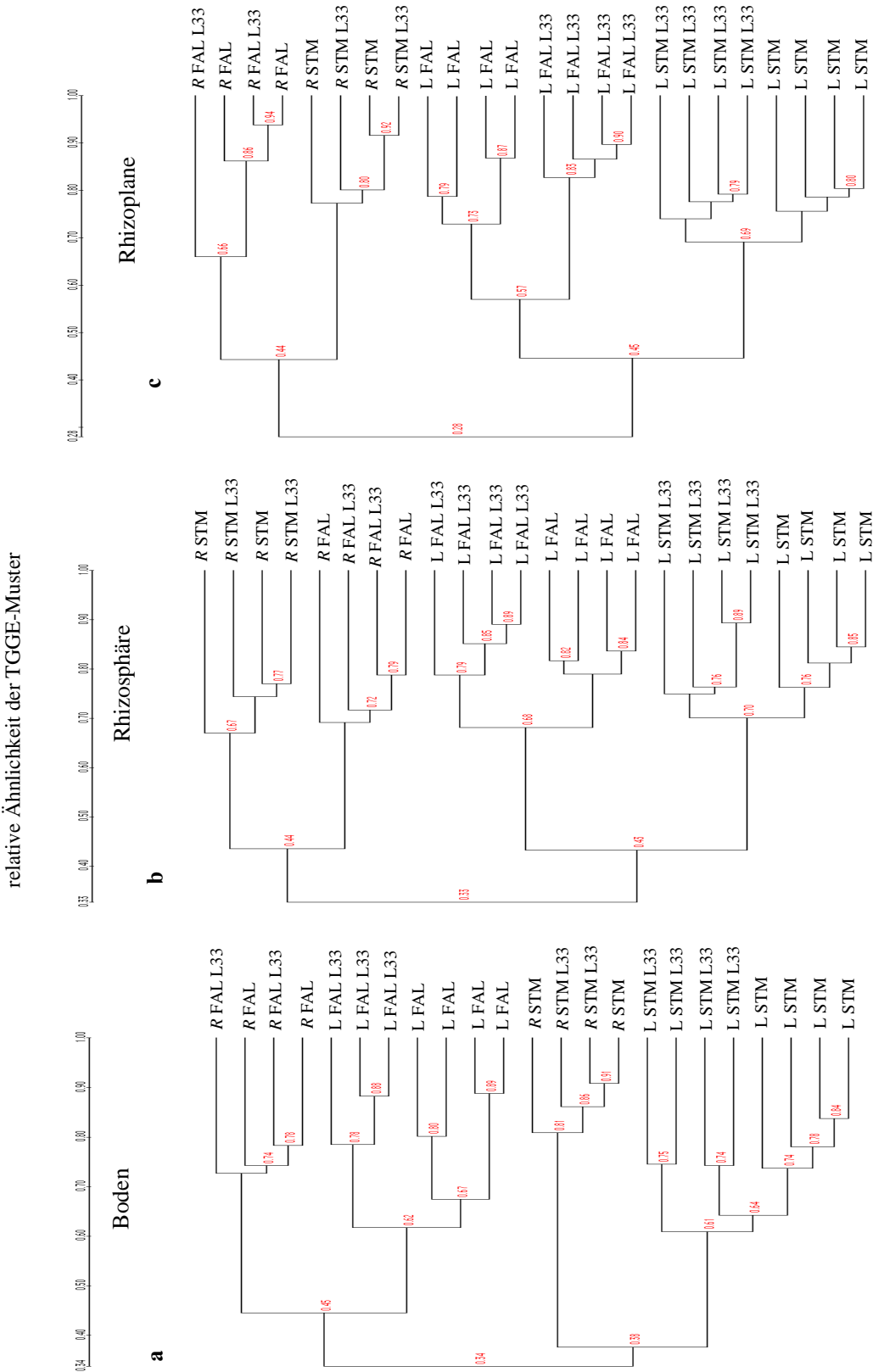


Abb. 23: Clusteranalyse der aus der Amplifikation der 16S rRNA mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 resultierenden TGGE Muster der Habitate Boden (a), Rhizosphäre (b) und Rhizoplane (c). In zwei (Roggen) bzw. vier (Luzerne) unabhängigen Wiederholungen pro Versuchsvariante wurde Roggen („R“) und Luzerne („L“) in den beiden Bodentypen FAL- und STM-Boden angezogen. Mikrokosmen, in denen eine Inokulation mit dem gentechnisch veränderten *S. meliloti*-Stamm erfolgte, sind durch „L33“ gekennzeichnet.

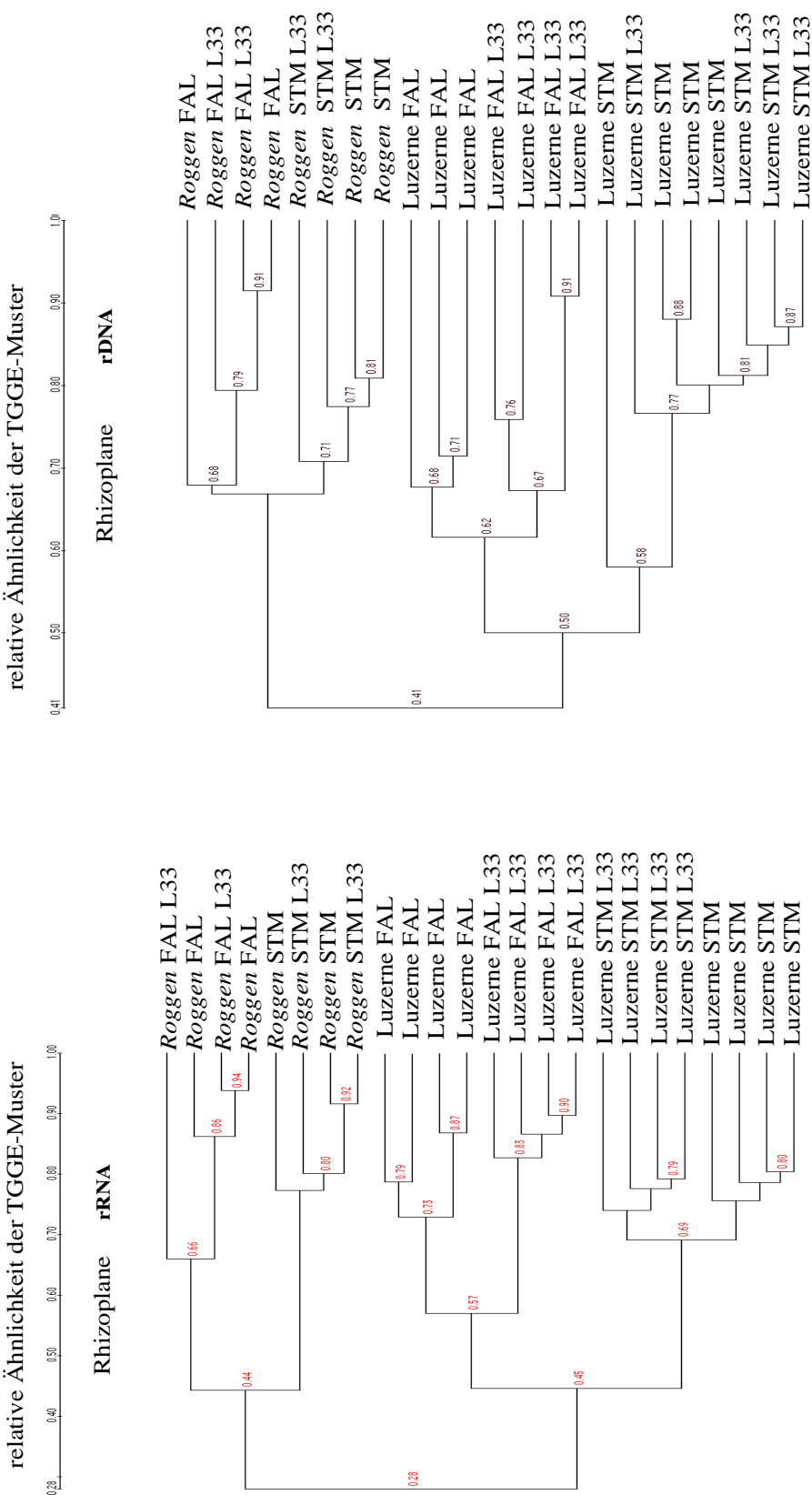


Abb. 24:  
Clusteranalyse der aus der Amplifikation der 16S rRNA (links, entspricht Abb. 23c) bzw. 16S rDNA (rechts) mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 resultierenden TGGE Muster der Rhizoplane. In zwei (Roggen) bzw. vier (Luzerne) unabhängigen Wiederholungen pro Versuchsvariante wurden die Pflanzen in den beiden Bodentypen FAL- und STM-Boden angezogen. Mikrokosmen, in denen eine Inokulation mit dem gentechnisch veränderten *S. meliloti*-Stamm erfolgte, sind durch „L33“ gekennzeichnet.



Anhand der Clusteranalysen der RNA-Muster (Abb. 23 a,b,c) zeigte sich, daß sich in allen Habitaten die Muster unterschieden, wenn die Pflanzen in verschiedenen Böden kultiviert wurden. Während der Bodentyp in der Fraktion des Bodens den größten Einfluß auf die Musterbildung hatte, wurde dessen Beeinflussung in den Habitaten Rhizosphäre und Rhizoplane jedoch geringer. In diesen Habitaten führte die Pflanzenspezies zu den größten Unterschieden in den RNA-TGGE-Mustern.

Gegenüber diesen Faktoren waren die Auswirkungen auf die bakterielle Gemeinschaft durch eine Inokulation mit L33 deutlich geringer ausgeprägt und nur in den Luzernehabitaten detektierbar. Allerdings war in der Bodenfraktion der Inokulationseffekt im STM-Bodentyp im Gegensatz zum FAL-Bodentyp nur sehr begrenzt nachweisbar. Die Bandenmuster aus den nicht-inokulierten STM-Böden gruppieren zwar zusammen, waren aber anhand der Clusteranalyse nicht deutlich von den inokulierten Varianten zu trennen. Dagegen waren sowohl in der Rhizosphäre als auch Rhizoplane Unterschiede durch eine Inokulation im STM-Boden detektierbar. Die Bandenmuster aus den nicht-inokulierten Luzernemikrokosmen des FAL-Bodentyps zeigten in allen Habitaten Unterschiede zu den inokulierten Varianten auf, wobei die Clusteranalyse ergab, daß die Unterschiede am deutlichsten in der Rhizoplane ausgeprägt waren. Während in der Rhizosphäre das Ausmaß der durch die Inokulation mit L33 bedingten Veränderungen in den beiden Bodentypen ähnlich war, waren in der Rhizoplane die durch eine Inokulation bedingten Musterunterschiede im FAL-Bodentyp stärker ausgeprägt als im STM-Bodentyp.

Bei Roggen konnte keine durch eine Inokulation bedingte Veränderung im TGGE-Muster aufgezeigt werden. In allen Varianten (Bodentyp und Habitat) gruppieren die aus den inokulierten Ansätzen stammenden TGGE-Muster des Roggens mit denen aus den nicht-inokulierten Ansätzen zusammen.

In Abb. 24 ist das Ergebnis der Clusteranalyse der DNA-TGGE-Muster im Vergleich zu dem der RNA-Muster der Rhizoplane dargestellt. Bei beiden Clusteranalysen zeigte zwar die Pflanzenart den größten Einfluß auf die Musterbildung, gefolgt von den Veränderungen bedingt durch die verschiedenen Bodentypen. Allerdings waren die durch die verschiedenen Variationen hervorgerufenen Unterschiede in den DNA-Mustern deutlich geringer ausgeprägt als die in den RNA-Mustern. Effekte durch eine Inokulation mit L33 in den DNA-Mustern waren weder bei Roggen noch bei Luzerne im STM-Bodentyp nachweisbar, sondern nur im FAL-Bodentyp der Luzerne. Im Vergleich zu den Beeinflussungen durch die Pflanzenart und den Bodentyp waren aber auch diese Veränderungen in den Luzernemustern deutlich geringer. Zudem war die Variabilität der resultierenden DNA-Muster aus den parallelen Aufarbeitungen der Luzerneproben des FAL-Bodentyps relativ hoch.

Zusammenfassend ergaben die TGGE-Untersuchungen anhand von universellen Primern, daß Auswirkungen einer Inokulation mit L33 auf die bakterielle Gemeinschaft der Wirtspflanze prinzipiell detektierbar waren, wobei die Größe der Beeinflussung von dem jeweiligen Bodentyp abhing. Allerdings waren diese Beeinflussungen gegenüber den Musterveränderungen durch die Faktoren Pflanzenart und Bodentyp deutlich geringer ausgeprägt.

Um zu untersuchen, ob auch in diesem Gewächshausversuch eine Inokulation von *S. meliloti* insbesondere bei nahe verwandten Bakterien zu einer Beeinflussung führte, wurden TGGE-Analysen von PCR-Produkten durchgeführt, die mit dem für Sinorhizobien und verwandten Sequenzen spezifischen Primer R1463 amplifiziert wurden. Da sich bei der Verwendung des Primerpaares F984-GC/R1346 eine Veränderung im Bandenmuster durch die Inokulation mit L33 am stärksten in den RNA-TGGE-Mustern der Rhizoplanefraktion zeigte, wurden für diese Untersuchungen die rRNA-Extrakte dieser Fraktion eingesetzt (Abb. 25).

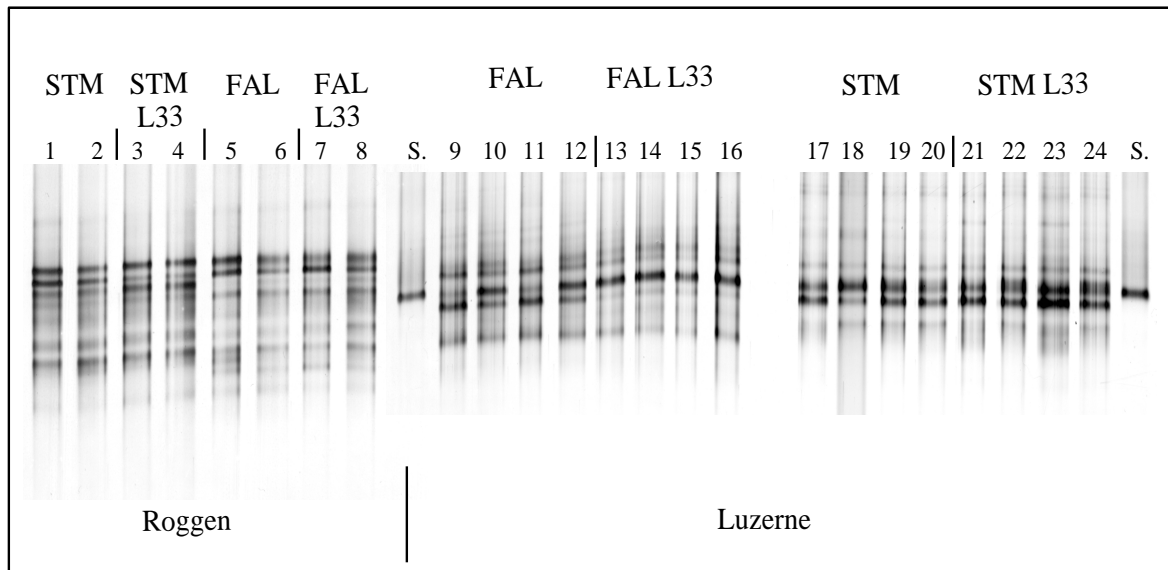


Abb. 25: Vergleich der aus der Amplifikation der RNA mit dem Primerpaar R984-GC/R1463 resultierenden TGGE-Muster der Rhizoplane. (Zusammenstellung aus zwei verschiedenen Gelen, Gel 1: Spur 1-8, Gel 2: ab Spur 9. Die Ausrichtung der beiden Gele erfolgte durch Abgleichung an der aus der Amplifikation der DNA einer Reinkultur von *S. meliloti* WT 2011 mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 resultierenden Markerbande „S“). Dargestellt sind jeweils die beiden Wiederholungen jeder Versuchsvariante der Roggenpflanzen (Spur 1-8) bzw. die vier unabhängigen Wiederholungen der Luzerne (Spur 9-24). Die verschiedenen Varianten sind durch folgende Abkürzungen gekennzeichnet: FAL: FAL-Bodentyp, STM: STM-Bodentyp, L33: inokuliert mit *S. meliloti* L33.

Die erhaltenen TGGE-Muster zeigten, abgesehen von einer Bande im Luzernemuster im FAL-Boden (Bande 5 in Abb. 26), eine hohe Kongruenz der unabhängigen Wiederholungen der einzelnen Varianten. Im Vergleich zu den Mustern nach einer Amplifikation mit universellen Primern war aber auch hier die Komplexität der Muster deutlich reduziert (Abb. 25, vgl. Kap. 3.6.2). Um diese TGGE-Muster näher zu charakterisieren, wurden exemplarisch einige Banden aus den Bandenmustern der Luzerne eluiert, kloniert und sequenziert. Die anhand der Datenbanken ermittelten nächsten verwandten Sequenzen sind in Abb. 26 dargestellt und ergaben alle eine Zugehörigkeit zu der *Rhizobium-Agrobacterium* Gruppe der  $\alpha$ -Proteobakterien.

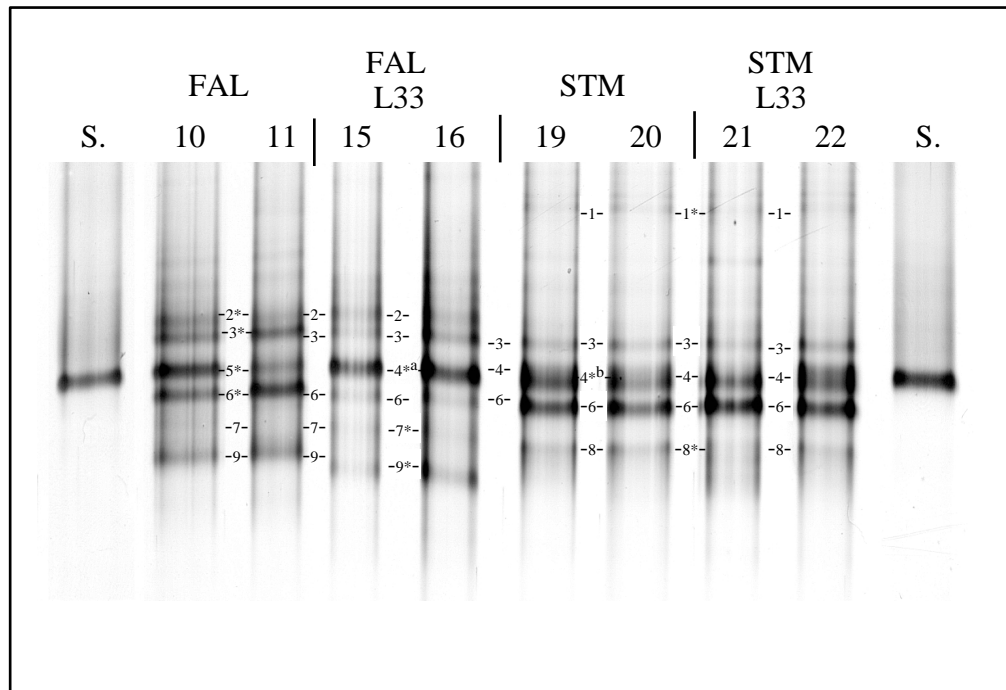


Abb. 26: 16S rRNA Partialsequenzen eluierter Banden aus dem TGGE-Bandenmuster der Luzernerhizoplane mit Angaben der Ähnlichkeiten zu verwandten Datenbankreferenzen. Dargestellt sind die aus der Amplifikation der 16S rRNA mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 resultierenden TGGE-Muster von jeweils zwei der vier unabhängigen Wiederholungen der Luzernepflanzen der verschiedenen Versuchsvarianten aus Abb. 25. Die aus der Amplifikation mit dem selben Primerpaar resultierende TGGE-Bande einer Reinkultur von *S. meliloti* WT 2011 ist mit „S” gekennzeichnet. Banden mit der gleichen Numerierung zeigen ein identisches Laufverhalten in den verschiedenen Versuchsansätzen, die mit \* markierten Banden wurden eluiert, kloniert und sequenziert.

Banden-nummer	Bezeichnung der eluierten Bande	Ähnlichkeit zu verwandten Datenbanksequenzen
1*	AF 1	<i>Rhizobium galegae</i> IAM 13631 (97,6%)
2*	AF 2	<i>Phyllobacterium rubiacearum</i> (98,7%) <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (98,7%)
3*	AF 3	<i>Sinorhizobium meliloti</i> IAM 12611 (98,3%)
4* <sup>a</sup>	AF 4a	<i>Sinorhizobium meliloti</i> LMG 6133 (100%)
4* <sup>b</sup>	AF 4b	<i>Sinorhizobium meliloti</i> LMG 6133 (99,8%)
5*	AF 5	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IAM 12609 (98,5%)
6*	AF 6	<i>Sinorhizobium meliloti</i> LMG 6133 (98,7%)
7*	AF 7	<i>Sinorhizobium fredii</i> IAM 13625 (98,7%) <i>Sinorhizobium xinjiangensis</i> (98,7%)
8*	AF 8	<i>Sinorhizobium meliloti</i> LMG 6133 (98,3%)
9*	AF 9	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IAM 12609 (100%)

Die Unterschiede im Luzernebandenmuster der Rhizoplane zwischen dem FAL- und dem STM-Bodentyp zeigten sich im Auftreten der Sequenzen AF 1 und AF 8 in dem STM-Bodentyp sowie der Sequenzen AF 2, 7 und 9 in dem FAL-Bodentyp. Durch eine Inokulation bedingte Veränderungen im Bandenmuster ließen sich im STM-Boden, im Gegensatz zum FAL-Boden, nicht aufzeigen. In allen aus dem STM-Bodentyp resultierenden Mustern zeigte je eine Bande ein identisches Laufverhalten zu dem Amplifikat des inokulierten Stammes. Beispielfhaft wurde eine Bande aus dem nicht-inokulierten Ansatz sequenziert (Bande 4\*<sup>b</sup>), wobei eine Ähnlichkeit von 99,8% zu *S. meliloti* ermittelt wurde.

Die aus den inokulierten Varianten des FAL-Bodens resultierenden Muster unterschieden sich durch das fast vollständige Fehlen der Bande 6 (Abb. 26, Spur 15-16; Ähnlichkeit der Sequenz AF 6 zu *S. meliloti*: 98,7%) von den nicht-inokulierten Varianten des FAL-Bodens. Zudem war die in den inokulierten Ansätzen des FAL-Bodens dominierende Bande 4 (Ähnlichkeit der Sequenz AF 4\*<sup>a</sup> zu *S. meliloti*: 100%), die ein identisches Migrationsverhalten zu dem Amplifikat des inokulierten Stammes L33 zeigte (s. Abb. 26 Spur S), in den nicht-inokulierten Ansätzen nicht nachweisbar. Die in den nicht-inokulierten Ansätzen in unterschiedlicher Stärke auftretende Sequenz 5, die ein ähnliches Laufverhalten zu der Bande 4 zeigte, wies eine andere Partialsequenz auf (Ähnlichkeit der Sequenz AF 5 zu *Rhizobium leguminosarum*: 98,5%). Dies deutet auf eine Verdrängung der beiden Sequenzen AF 5 und AF 6 durch eine Inokulation mit L33 hin.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse der Sequenzanalysen wurden die Ähnlichkeiten der Muster durch eine Clusteranalyse dargestellt (Abb. 27), wobei berücksichtigt wurde, daß die im FAL-Boden auftretenden Sequenzen AF 5 (nicht-inokulierte) und AF 4 (inokulierte Ansätze) zwar ein ähnliches Laufverhalten zeigten, aber aufgrund der Sequenzanalysen als unterschiedliche Bandentypen eingeordnet werden mußten.

Das hieraus resultierende Clusterdendrogramm ergab, daß sich, wie auch bei der Verwendung der universellen Primern, die aus der Roggenrhizoplane resultierenden Muster sehr deutlich von denen der Luzerne unterschieden. Auch der Einfluß des Bodentyps war bei beiden Pflanzenarten, wenn auch erheblich geringer, aufzeigbar.

Eine durch die Inokulation bedingte Veränderung konnte nur in den Luzernemustern des FAL-Bodentyps detektiert werden, da sich nur bei dieser Variante die Muster aller vier unabhängigen Wiederholungen der nicht-inokulierten von denen der inokulierten Ansätze unterschieden. Diese durch die Inokulation hervorgerufenen Veränderungen waren jedoch deutlich stärker als die Beeinflussungen durch den Bodentyp.

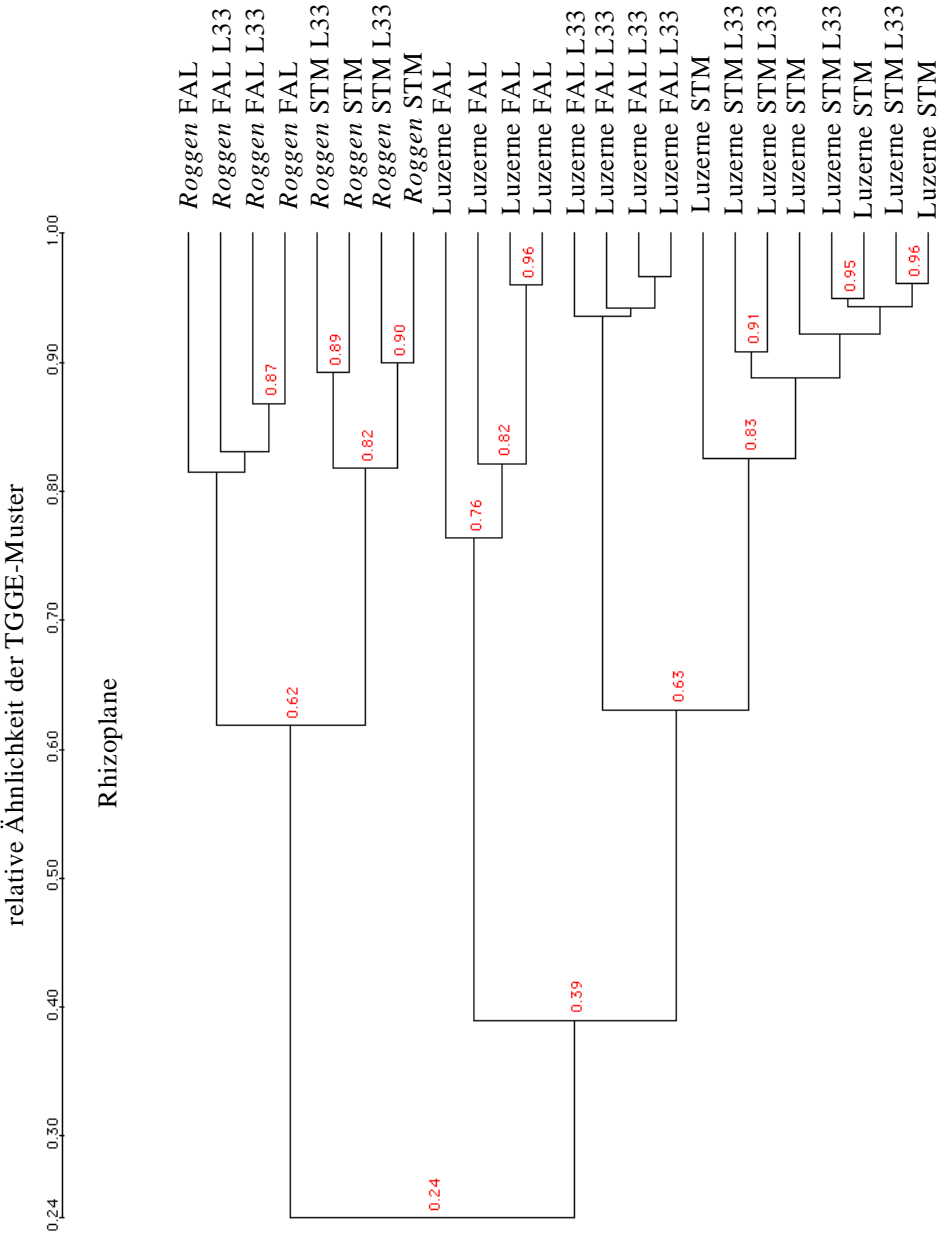


Abb. 27: Clusteranalyse der TGGE-Muster der Rhizoplane nach Amplifikation der 16S rRNA mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 auf Grundlage der Sequenzierungsergebnisse. Die Pflanzen wurden in den beiden Bodentypen FAL- und STM-Boden angezogen. Mikrokosmen, in denen eine Inokulation mit dem gentechnisch veränderten *S. meliloti*-Stamm erfolgte, sind durch „L33“ gekennzeichnet.

### 3.6.4 Untersuchung der natürlichen Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft von Luzerne in Abhängigkeit des Alters der Wirtspflanze und bei verwandten Pflanzen

Um die Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft im zeitlichen Verlauf der Wirtspflanzenentwicklung zu untersuchen, wurde Luzerne unter denselben experimentellen Bedingungen (vgl. Kap. 3.6.3) angezogen und im Abstand von zwei Wochen die bakterielle Gemeinschaft des Bodens, der Rhizosphäre und Rhizoplane durch Amplifikation der 16S rRNA mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 und Auftrennung auf der TGGE analysiert. Zusätzlich wurden ein weiterer Bodentyp (BBA-Boden) sowie zwei weitere Pflanzen, Klee und Bohne, mit in die Untersuchungen einbezogen.

Allerdings wurde in diesem Versuchsansatz die Amplifikation der 16S rRNA-Extrakte aus der Bodenfraktion, teilweise auch aus der Rhizosphärenfraktion gehemmt, wahrscheinlich aufgrund der stärkeren Verunreinigung dieser Extrakte. Aus diesem Grund wurde für die Amplifikation statt der *rTth*-DNA-Polymerase die weniger hemmstoff-sensible M-MLV reverse Transkriptase benutzt. Um eine Vergleichbarkeit der TGGE-Muster aller Varianten dieses Versuchsansatzes zu gewährleisten, wurden alle rRNA-Extrakte, auch die aus der Fraktion der Rhizoplane, mit diesem Enzym amplifiziert.

Die jeweils aus den vier unabhängigen Wiederholungen jeder Variante resultierenden TGGE-Muster zeigten eine relativ hohe Kongruenz, was in Abb. 28 beispielhaft für einen Teil der erhaltenen RNA-TGGE-Muster der Rhizosphäre dargestellt ist.

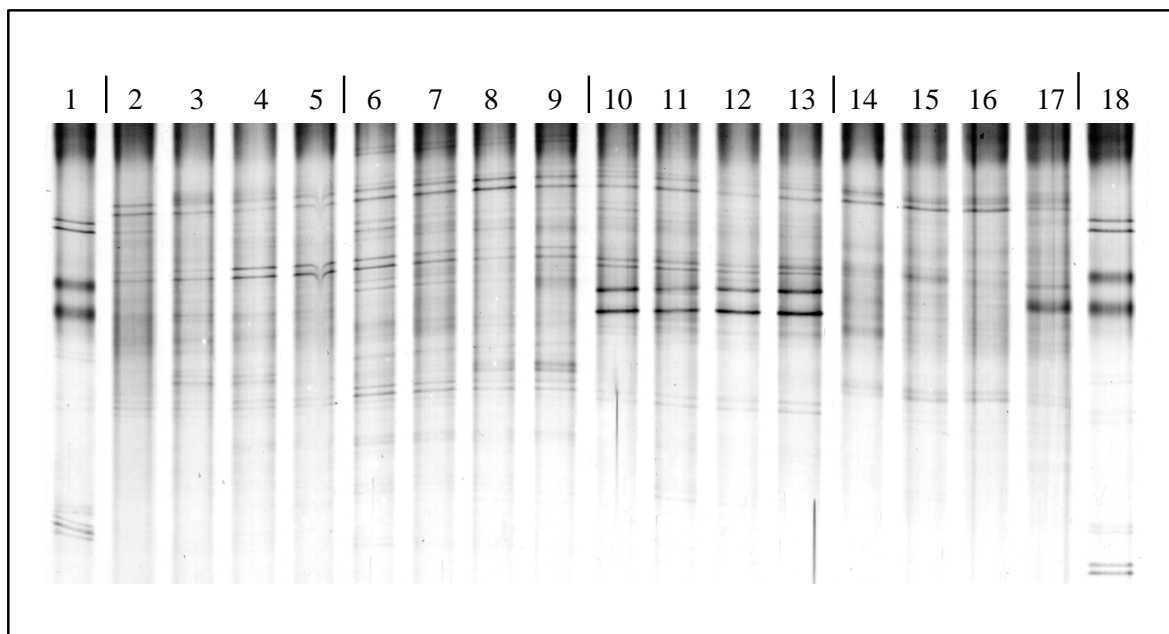


Abb. 28: Darstellung der Kongruenz der aus der Amplifikation von RNA-Extrakten der vier unabhängigen Wiederholungen einer Versuchsvariante resultierenden TGGE-Muster. Dargestellt sind die Amplifikate des Primerpaares F984-GC/R1346 aus der Rhizosphäre der Luzerne nach 10 Wochen im FAL-Bodentyp (Spur 2-5), nach 10 Wochen im BBA-Bodentyp (Spur 6-9), sowie aus der Rhizosphäre von Bohne (Spur 10-13) und Klee (Spur 14-17) im FAL-Boden. Marker: Spur 1 und 18.

Anhand der TGGE-Muster zeigte sich, daß die zeitliche Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft in allen untersuchten Habitaten der Luzerne relativ gering war, da sie sich nur in der Intensitätszu- und abnahme einer geringen Anzahl von Banden äußerte. In Abb. 29 ist beispielhaft je ein RNA-Muster der vier unabhängigen Parallelen der Rhizoplane der verschiedenen Varianten dargestellt. Insbesondere die im oberen Teil des Gels (Abb. 29, Spur 1-5) aufgetrennten Sequenzen zeigten eine zeitliche Variabilität, die anhand der Zu- bzw. Abnahme der Bandenintensitäten im Laufe des Pflanzenwachstums erkennbar war. Bei vielen Sequenzen blieb aber die Intensität während des gesamten Zeitraumes gleich.

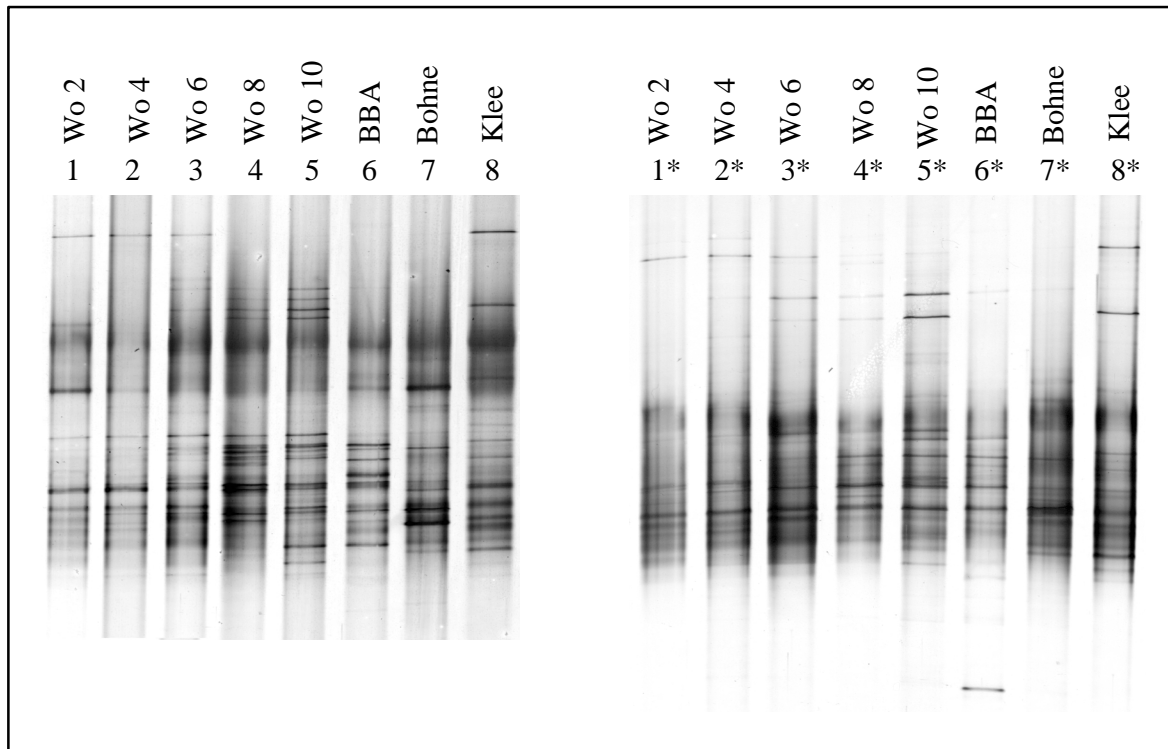


Abb. 29: Einfluß verschiedener reverser Transkriptasen auf die TGGE-Musterbildung. Dargestellt sind die aus der Amplifikation der 16S rRNA resultierenden Muster bei Verwendung der *rTth*-DNA-Polymerase (Spur 1-8) und der M-MLV-reversen Transkriptase (Spur 1\*-8\*), wobei jeweils derselbe RNA-Extrakt einer Versuchsvariante der Rhizoplane mit beiden Enzymen amplifiziert wurde. (Zusammenstellung aus zwei verschiedenen Gelen, Gel 1: Spur 1-8; Gel 2: Spur 1\*-8\*.) Die Amplifikate folgender Versuchsvarianten wurden aufgetragen: Rhizoplane der Luzerne nach 2 (Spur 1/1\*), 4 (Spur 2/2\*), 6 (Spur 3/3\*), 8 (Spur 4/4\*) und 10 (Spur 5/5\*) Wochen Wachstum im FAL-Boden und nach 10 Wochen im BBA-Boden (Spur 6/6\*); sowie Bohne (Spur 7/7\*) und Klee jeweils im FAL-Boden (Spur 8/8\*).

Um auch hier die Größenordnungen der Ähnlichkeiten aller erhaltenen RNA-TGGE-Muster zu ermitteln, wurde von allen Habitaten eine Clusteranalyse durchgeführt (Abb. 30). Hierbei zeigte sich, daß sich im Boden aufgrund der geringen Variabilität der mikrobiellen Gemeinschaft in den verschiedenen Wachstumsstadien die Muster der Luzerne nicht deutlich unterscheiden ließen. Dagegen gruppieren die aus der 8. und 10. Woche sowie die aus der 2. Woche resultierenden TGGE-Muster der Rhizosphäre und Rhizoplane jeweils getrennt von denen der anderen Zeitpunkte. Im

Vergleich hierzu führten aber die Beeinflussungen durch den Bodentyp oder die Pflanzenart zu deutlich stärkeren Veränderungen in den Bandenmustern.

Der Einfluß des Bodentyps auf die Musterbildung war vor allem in den Bodenfraktionen nachzuweisen, wo er größer war als der Einfluß der Pflanzenspezies (Abb. 30). Dagegen waren in der Rhizosphäre und Rhizoplane die Beeinflussungen durch den Bodentyp geringer als die Veränderungen durch die Pflanzenspezies. Die Muster der bakteriellen Gemeinschaften der anderen Leguminosenpflanzen unterschieden sich deutlich von denen der Luzernepflanzen, wobei anhand der Clusteranalyse ein stärker werdender Einfluß der Pflanze vom Boden zur Rhizoplane auf die Musterbildung aufzeigbar war.

Da – wie oben erwähnt – die rRNA-Extrakte der Rhizoplane im Gegensatz zu denen der anderen Habitaten keine Hemmungen der Amplifikation mit der *rTth*-DNA Polymerase zeigten, wurden exemplarisch einige Rhizoplane-Extrakte mit diesem Enzym amplifiziert. Die resultierenden TGGE-Muster wurden mit denen aus der Amplifikation mittels der M-MLV-reversen Transkriptase verglichen, wobei jeweils derselbe RNA-Extrakt mit beiden Enzymen amplifiziert wurde (Abb. 29). Zwar unterschieden sich bei beiden Enzymen die Muster der anderen Leguminosen deutlich von denen der Luzerne, und auch die zeitliche Variabilität war in der Ab- und Zunahme einiger Sequenzen im Laufe der Wirtspflanzenentwicklung erkennbar. Trotzdem zeigten sich im Detail deutliche Unterschiede, so daß die Verwendung derselben Enzyme bzw. Amplifikationsbedingungen als eine zwingende Voraussetzung für den Vergleich der TGGE-Muster angesehen werden muß.

Um die Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft im zeitlichen Verlauf der Wirtspflanzenentwicklung mit dem Ausmaß des Einflusses anderer Faktoren (Pflanze, Bodentyp, Inokulation) vergleichen zu können, wurden alle 16S rRNA-Extrakte der Rhizoplane unter identischen Bedingungen amplifiziert, wobei die *rTth*-DNA-Polymerase verwendet wurde. Die erhaltenen TGGE-Muster aus den RNA-Extrakten dieser Untersuchungen und der des Vorjahres (Kap. 3.6.3) wurden anschließend anhand einer Clusteranalyse miteinander verglichen (Abb. 31).

Hierbei zeigte sich, daß sich sowohl an den Roggen- als auch an den Bohnenpflanzen eine deutlich andersartige bakterielle Gemeinschaft ausbildete, während sich die RNA-TGGE-Muster des Klees weniger stark von denen der Luzerne unterschieden. Die Veränderung durch den Bodentyp war in allen Fällen geringer als der Einfluß der Pflanzenart.

Der Vergleich der Luzernemuster im FAL-Boden zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen der beiden Jahre: Die TGGE-Muster der „Luzerne FAL“ (Luzerne im FAL-Boden aus dem Versuchsansatz zur Untersuchung der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft durch Inokulation mit L33) gruppieren deutlich anders als die Muster von „Wo 10“ (Luzerne im FAL-Boden aus dem Versuchsansatz zur Untersuchung der zeitlichen Variabilität).

Trotz dieser Unterschiede zeigte die Clusteranalyse, daß die Veränderungen der Luzerne-Bandenmuster durch eine Inokulation mit *S. meliloti* L33 im FAL-Boden im Vergleich zu den Faktoren Pflanze und Bodentyp relativ gering waren. In Bezug auf die aus den Untersuchungen zur zeitlichen Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft in Abhängigkeit von der Wirtspflanzenentwicklung resultierenden Muster lagen diese Unterschiede jedoch ungefähr in derselben Größenordnung.



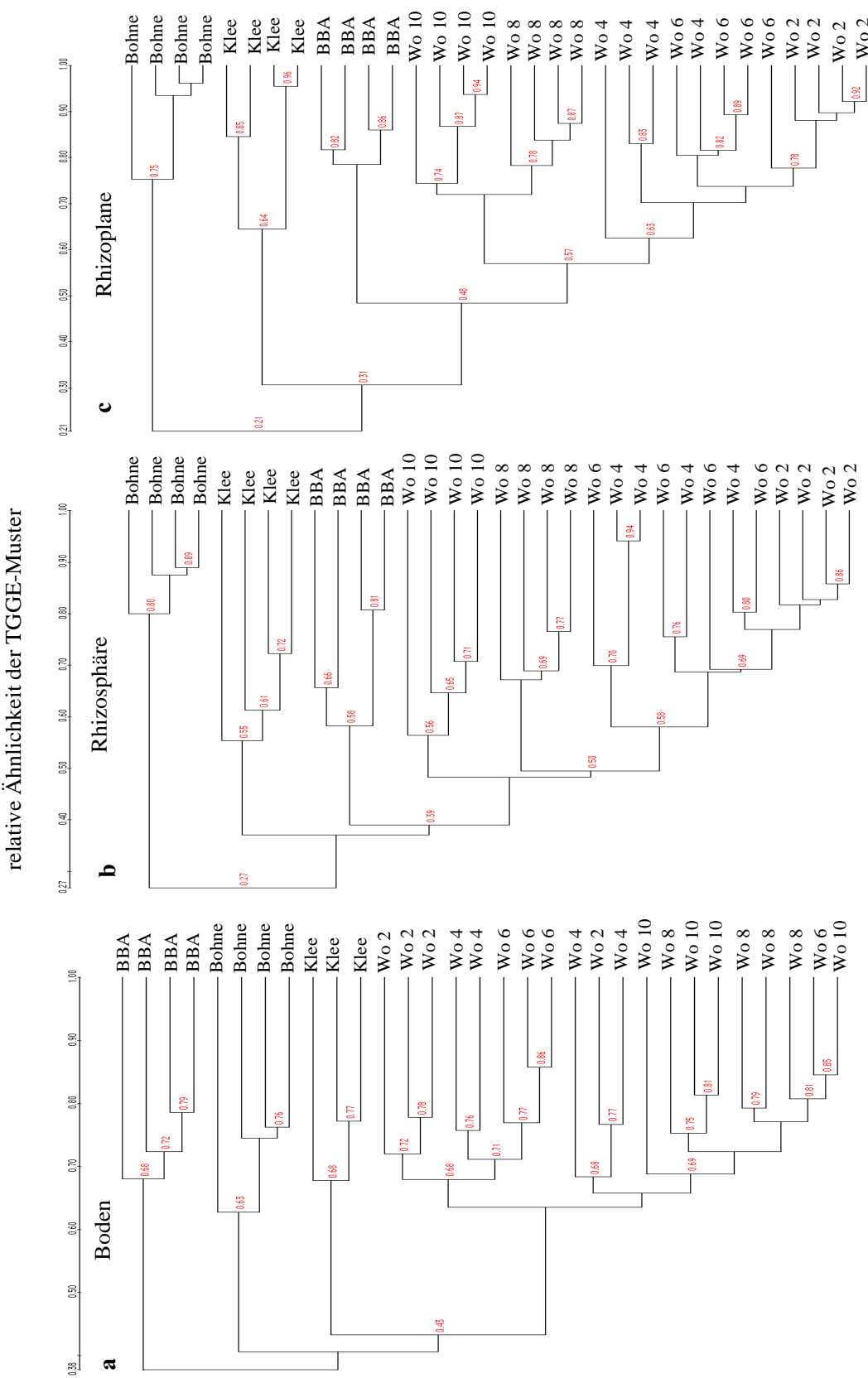


Abb. 30: Clusteranalyse der aus der Amplifikation der 16S rRNA mit dem Primerpaar F984-GC/R1346 resultierenden TGGE-Muster der Habitate Boden (a), Rhizosphäre (b) und Rhizoplane (c). Dargestellt ist die Ähnlichkeit der TGGE-Muster der verschiedenen Versuchsvarianten (jeweils in vier unabhängigen Wiederholungen) der Luzerne nach 2 (Wo2), 4 (Wo4), 6 (Wo6), 8 (Wo8) und 10 (Wo10) Wochen Wachstum im FAL-Boden; im BBA-Boden nach 10 Wochen (BBA); sowie Bohne und Klee im FAL-Boden.

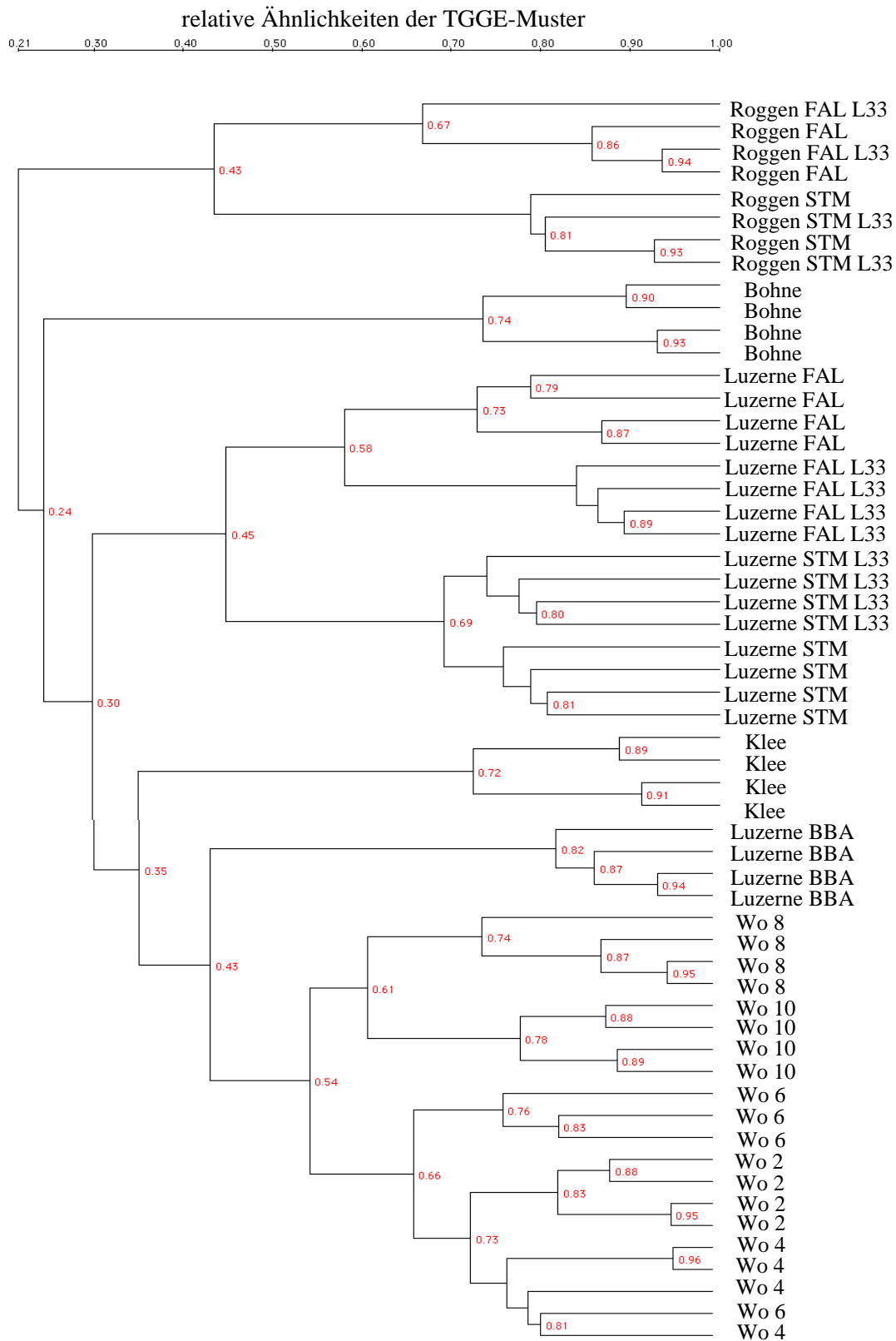


Abb. 31: Clusteranalyse der TGGE-Muster der Rhizoplane nach Amplifikation der 16S rRNA mit dem Primerpaar F984-GC/R1346. Luzerne wurde in drei verschiedenen Bodentypen angezogen: BBA, FAL und STM-Boden, wobei die Untersuchungen der zeitlichen Variabilität der mikrobiellen Gemeinschaft der Luzerne (Wo=Woche 2-10), ebenso wie die Untersuchungen von Bohne und Klee ein Jahr später im FAL-Boden erfolgten. Mikrokosmen, in denen eine Inokulation mit dem gentechnisch veränderten *S. meliloti*-Stamm erfolgte, sind durch „L33“ gekennzeichnet.

In Tab. 5 sind die Ergebnisse der Nodulationsuntersuchungen beider Versuchsansätze (Untersuchung der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation mit L33 [Kap. 3.6.3] und die Untersuchung der zeitlichen Variabilität) an den Luzernewurzeln dargestellt. Hierbei zeigte sich, daß im nicht-inokulierten FAL-Boden der prozentuale Anteil der nodulierten Wurzeln deutlich geringer war als in den anderen Böden, was auf eine geringere endogene Population von Sinorhizobien im FAL-Boden hinweist. Durch eine Inokulation mit L33 konnte in den beiden Bodentypen FAL und STM der Anteil der nodulierten Wurzeln deutlich erhöht werden (Tabelle 5a), im FAL-Boden führte die Inokulation sogar zu einer Nodulation aller untersuchten Wurzeln. Die Anzahl der Knöllchen pro nodulierter Wurzel lag bei allen Versuchsvarianten in der selben Größenordnung (ca. 6 Knöllchen pro Wurzel).

Während der Wachstumsperiode zeigten die Luzernepflanzen im STM- und BBA-Boden im Vergleich zum FAL-Boden ein kräftigeres Wachstum, ebenso wie die inokulierten Luzernepflanzen im Vergleich zu den nicht-inokulierten Pflanzen im FAL-Boden. Nach 8-10 Wochen war allerdings in allen Versuchsvarianten der Wachstumsunterschied in den verschiedenen Versuchsvarianten deutlich geringer. Nach 10 Wochen war nur noch im BBA-Boden das durchschnittliche Pflanzengewicht der Luzerne im Vergleich zum FAL-Boden signifikant erhöht (Student-t-Test;  $\alpha=0,05$ ). Signifikante Unterschiede im Pflanzenwachstum durch eine Inokulation waren nicht mehr zu beobachten.

Tab. 5: Ausmaß der Wurzelnodulation und Pflanzengewichte der Luzerne nach 10 Wochen Wachstum in verschiedenen Bodentypen.

**a: Versuchsansatz:** Untersuchung des Ausmaßes der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation mit *S. meliloti* L33 an der Wirtspflanze Luzerne im Vergleich zu Roggen in verschiedenen Bodentypen (Kap. 3.6.3).

Versuchsvarianten der Luzerne	FG Wurzel [g/Mikrokosmos]	FG Sproß [g/Mikrokosmos]	TG Sproß [g/Mikrokosmos]	Nodulierte Pflanzen* [%]
FAL-Boden nicht-inokuliert	31,0	68,2	15,4	48
FAL-Boden inokuliert mit L33	34,1	61,6	15,1	100
STM-Boden nicht inokuliert	34,6	70,9	17,2	68
STM-Boden inokuliert mit L33	38,8	66,2	16,5	93

**b: Versuchsansatz:** Untersuchung der natürlichen Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft von Luzerne in Abhängigkeit des Alters der Wirtspflanze und bei verwandten Pflanzen.

Versuchsvarianten der Luzerne	FG Wurzel [g/Mikrokosmos]	FG Sproß [g/Mikrokosmos]	TG Sproß [g/Mikrokosmos]	Nodulierte Pflanzen* [%]
FAL-Boden	46,2	132,1	32,1	24
BBA-Boden	60,1	156,7	44,2	97

FG: Feuchtgewicht

TG: Trockengewicht

\*: Durchschnittswerte von jeweils 40 untersuchten Pflanzenwurzeln pro Versuchsvariante

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die TGGE zur Untersuchung komplexer boden- und wurzelassoziierter Habitate eingesetzt, um das Ausmaß der Veränderungen bakterieller Gemeinschaften durch verschiedene Einflüsse zu bestimmen. Vor der Diskussion dieser Ergebnisse ist es jedoch sinnvoll, zunächst die Eignung der TGGE als Methode zur Darstellung bakterieller Gemeinschaften darzustellen. Neben den methodischen Weiterentwicklungen werden deshalb zunächst die Grenzen der TGGE-Analyse, sowohl bei der Interpretation eines Musters als auch bei einem Mustervergleich, diskutiert.

### 4.1 Weiterentwicklungen der TGGE-Analyse

- **Entwicklung von PCR-Primern**

- Universelle Primer zur Amplifikation der Region V1-V3 der 16S rDNA

Die derzeit in der Literatur beschriebenen universellen T-/DGGE-Primer decken unterschiedliche Bereiche der 16S rDNA ab. Das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete universelle Primerpaar F984-GC/R1346 (Felske *et al.*, 1996; Engelen, 1998) amplifiziert den Bereich 968-1346 der 16S rDNA (*E. coli* Numerierung). Andere universelle Primer für T-/DGGE Analysen decken die Bereiche 968-1401 (Nübel *et al.*, 1997; Heuer & Smalla, 1997); 1055-1406 (Santegoeds *et al.*, 1996; Ferris *et al.*, 1996), 341-534 (Muyzer *et al.*, 1993) und 341-925 (Muyzer *et al.*, 1995) ab.

Da für Partialsequenzierungen unbekannter Sequenzen häufig die ersten 500 Basenpaare der 16S rDNA genutzt werden, ist die Anzahl der Sequenzinformationen aus diesem Bereich, die in den Datenbanken hinterlegt sind, entsprechend groß. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, universelle Primer für die TGGE Anwendung zu modifizieren, mit denen dieser Bereich amplifizierbar ist. Hierzu geeignete Primer sind F26 und R519, da dieses Primerpaar einen sehr großen Teil von Sequenzen der Domäne *Bacteria* erfaßt und somit als universell angesehen werden kann (Lane *et al.*, 1985; Lane, 1991).

Die Anwendung dieses Primerpaares bei der Untersuchung sowohl von DNA- als auch RNA-Extrakten aus Umweltproben komplexer Habitate führte zu einer guten Auftrennung einer Vielzahl von Banden auf der TGGE (s. Abb. 5). Hierbei lag die Anzahl der auftrennbaren Banden ungefähr in der selben Größenordnung wie bei Verwendung des Primerpaares F984-GC/R1346. Da das Primerpaar F26-GC/R519 für die Anwendung auf der TGGE erst am Ende dieser Arbeit entwickelt wurde, konnten noch keine weiteren Analysen durchgeführt werden, wie z. B. die Charakterisierung einzelner Bandenmuster im Vergleich zu denen, die aus der Amplifikation anderer universeller Primer resultierten. Hierbei wäre zu untersuchen, ob die jeweiligen dominanten Banden denselben Sequenzen zuzuordnen sind. Dies erscheint auch deshalb sinnvoll, da mit diesem Primerpaar, wie auch mit anderen universellen Primerpaaren (Weller *et al.*, 1991; Marchesi *et al.* 1998), sicherlich nicht alle Sequenzen erfaßt werden können. Aufgrund der bisherigen Untersuchungen scheint das Primerpaar F26-GC/R519 jedoch vielversprechend für TGGE-Analysen der V1-V3-Region der 16S rRNA und 16S rDNA sowohl von Reinkulturen als auch von Umweltproben zu sein.

- Primer R1463 zur Amplifikation von *S. meliloti* und verwandten Sequenzen

In dieser Arbeit wurden Auswirkungen einer Inokulation von *Sinorhizobium meliloti*-Stämmen auf die bakterielle Gemeinschaft untersucht. Um zu ermitteln, ob hierdurch verwandte Bakterien zu *Sinorhizobium* beeinflusst wurden, erfolgte die Untersuchung anhand spezifischer Primer.

Vallaey *et al.* (1997) beschrieben die Entwicklung von Primern für DGGE-Anwendungen, mit denen spezifisch Rhizobien erfaßt werden sollten. Aufgrund von Untersuchungen von Yanagi & Yamasato (1993) wurden 16S rDNA-Regionen ausgewählt, die hohe Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen Rhizobienarten aufwiesen. Allerdings mußten zur Erfassung aller Rhizobienarten „gewobbelte“ Primer entwickelt werden, die diese Regionen flankieren. Dies führte zu multiplen DGGE-Banden einer Sequenz, weswegen diese Primer hier nicht angewendet wurden. Aus diesem Grund wurde der Primer R1463 entwickelt, der selektiv *S. meliloti* und verwandte Sequenzen erfaßt. Die Spezifitätsuntersuchungen, bei denen auch gezielt Sequenzen miteinbezogen wurden, die anhand von theoretischen Berechnungen aufgrund weniger Fehlpaarungen eine Amplifikation als möglich erschienen ließen, ergaben, daß nur Sequenzen innerhalb der  $\alpha$ -Proteobakterien erfaßt wurden, hauptsächlich aus der *Rhizobium-Agrobacterium* Gruppe. Allerdings kann dieser Primer nicht als gruppenspezifischer Primer angesehen werden, da einerseits hiermit nicht alle Sequenzen innerhalb der *Rhizobium-Agrobacterium* Gruppe erfaßt werden, andererseits auch einige Sequenzen aus anderen Gruppen der  $\alpha$ -Proteobakterien amplifizierbar sind.

Alle hier untersuchten *Sinorhizobium*- und *Rhizobium*-Arten konnten jedoch mit diesem Primer amplifiziert werden. Ebenso waren alle in der RDP-Datenbank hinterlegten *Sinorhizobium*- und *Rhizobium*-Arten prinzipiell erfaßbar, da sie keine oder nur eine Fehlpaarung aufwiesen, die eine Amplifikation nicht beeinträchtigen würde. In Kombination mit dem universellen Vorwärtsprimer F984 konnte anhand von definierten Modellgemeinschaften gezeigt werden, daß *S. meliloti*-verwandte Sequenzen bei Verwendung des spezifischen Primers auch dann noch selektiv amplifiziert werden, wenn die Nukleinsäuren anderer Bakterien in 1000fachen Überschuß vorlagen (Abb. 6). Mit dem universellen Primer R1346 waren diese Sequenzen dagegen nicht mehr detektierbar. Insofern erscheint der Primer R1463 geeignet, *Sinorhizobium*-verwandte Sequenzen auch bei einer sehr geringen Abundanz in einer Mischpopulation aus verschiedenen Sequenzen anzureichern.

Die Eignung des Primers für eine selektive Erfassung von *S. meliloti*-verwandten Sequenzen bestätigte sich auch in der Untersuchung von Umweltproben. In zwei verschiedenen Versuchsansätzen wurden TGGE-Banden sequenziert, die aus der Amplifikation mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 aus Rhizoplanehabitaten resultierten (Kap. 3.6.2 und 3.6.3). Die anhand der Datenbanken ermittelten nächsten verwandten Sequenzen ergaben alle eine Zugehörigkeit zu der *Rhizobium-Agrobacterium* Gruppe, was die Spezifität des Primers belegt.

Zudem zeigten die TGGE-Analysen der mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 amplifizierten Reinulturen zufriedenstellende elektrophoretische Auftrennungen. Ein Großteil der Amplifikate wies geeignete Sequenzunterschiede auf, die zu unterschiedlichen Schmelzdomänen führten, so daß eine Trennung anhand des Laufverhaltens möglich war. Allerdings zeigten einige wenige Amplifikate ein identisches Laufverhalten, was eine grundsätzliche Limitierung der TGGE darstellt (Kap. 4.2.1).

- **Clusteranalyse**

In einer Reihe früherer Untersuchungen zeigte sich, daß T-/DGGE-Analysen von 16S rRNA- und rDNA-Fragmenten aus unterschiedlichen Habitaten gut geeignet erscheinen, die räumliche und zeitliche Dynamik bakterieller Populationen zu verfolgen (Übersicht bei Muyzer & Smalla, 1998). Um Veränderungen in bakteriellen Gemeinschaften darzustellen, bietet sich ein Vergleich von T-/DGGE-Mustern an (s. Kap. 4.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu eine Methode entwickelt, die es erlaubt, TGGE-Bandenmuster durch Digitalisierung und Auswertung mit dem *Diversity-Database*-Softwareprogramm miteinander zu vergleichen, wobei die Ähnlichkeit der Muster durch eine Clusteranalyse dargestellt wurde. Da die Intensität einzelner Banden in einem TGGE-Muster – mit Einschränkungen – Rückschlüsse auf die Dominanz der entsprechenden Bakterien in einem Habitat zuläßt (diese Arbeit, Muyzer *et al.*, 1993, Duineveld *et al.*, 1998; Felske, 1999), wurde neben der Anzahl und dem Laufverhalten der Banden auch deren Intensität bei einem Mustervergleich berücksichtigt. Obwohl silbergefärbte T-/DGGE-Gele in früheren Arbeiten anhand von densitometrischen Analysen quantitativ ausgewertet wurden (Engelen, 1998; Felske *et al.*, 1998b; Eichner *et al.*, 1999), liegen bislang keine Veröffentlichungen über die Linearität der Signalstärke von silbergefärbten TGGE-Banden zur aufgetragenen Nukleinsäurekonzentration vor. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, daß eine Linearität nur in einem bestimmten Bereich der Signalstärke gewährleistet ist („Peak OD“: 0,015-0,6, bzw. „Trace OD: 0,01-0,8 [OD x mm]“, s. Kap. 3.3). Daher wurden nur die Bandentypen, bei denen alle Banden eine entsprechende Signalstärkeintensität aufwiesen, bei einer Auswertung berücksichtigt. Allerdings zeigte der weitaus größte Teil der Banden eine entsprechende Signalstärke.

Durch die Verwendung von Markerproben auf jedem Gel sowie den Abzug des Hintergrundsignals jeder Gelspur und der Hintergrundfärbung jedes TGGE-Geles war es möglich, nicht nur Bandenmuster innerhalb eines Geles, sondern auch auf verschiedenen Gelen miteinander zu vergleichen. Hierdurch konnte eine große Anzahl von Bandenmustern untereinander verglichen werden, so daß Unterschiede bzw. Veränderungen in TGGE-Mustern aus verschiedenen Versuchsvarianten in Relation zu der Variabilität der Muster der unabhängigen Wiederholungen dargestellt werden konnten. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die aus den unabhängigen Wiederholungen resultierenden Bandenmuster eine hohe Kongruenz aufwiesen (s. Abb. 18, 22, 28), ergaben sich teilweise nur relativ geringe Ähnlichkeiten in den Clusteranalysen (Musterähnlichkeiten von 0,7-0,9). Ähnliche Befunde wurden auch von Engelen (1998) und Duineveld *et al.* (1998) bei Clusteranalysen von TGGE-Gelen beschrieben. Mögliche Erklärungen hierfür sind, daß keine exakten Konzentrationsbestimmungen der auf der TGGE aufzutrennenden Amplifikatmengen vorgenommen wurden. Die vorherige Abschätzung der PCR-Produktkonzentrationen erfolgte in dieser Arbeit lediglich über eine Agarosegelelektrophorese (s. Kap. 3.1). Insofern wurden wahrscheinlich geringfügig unterschiedliche DNA-Mengen in den Gelspuren aufgetragen, was zu Unterschieden in den Gesamtintensitäten der Gelspuren führte. Hinzu kommt, daß bei einzelnen Banden die Zuordnung zu einem bestimmten Bandentyp anhand des Laufverhaltens offen gelassen wurde (Kap. 3.3), was ebenfalls dazu führte, daß die Musterähnlichkeiten weniger als 100% betrugen. Zudem wurde in dieser Arbeit aus den oben genannten Gründen die Bandenintensität berücksichtigt. Wurde eine Analyse nur anhand der Anzahl und des Laufverhaltens der Banden durchgeführt, wie z.B. bei Duineveld *et al.* (1998) beschrieben, so ergaben sich deutlich höhere Musterähnlichkeiten bei einer Clusteranalyse (0,9-0,98; nicht gezeigt).

Trotz dieser teilweise recht geringen Ähnlichkeitswerte der unabhängigen Wiederholungen konnten Beeinflussungen der Muster durch verschiedene Versuchsvarianten aufgezeigt werden (s. Kap. 4.3), wenn die dadurch bedingten Musterveränderungen größer waren als die Variabilität der Replikate. Bei dieser Analyse determiniert ausschließlich die Reproduzierbarkeit der Replikate die Nachweisempfindlichkeit von Beeinflussungen der mikrobiellen Gemeinschaft.

- **Charakterisierung von TGGE-Bandenmustern**

Neben der Erstellung von Bandenmustern bakterieller Gemeinschaften bieten T-/DGGE-Analysen zudem die Möglichkeit, einzelne Banden näher zu charakterisieren. Eine Möglichkeit der Charakterisierung von Bandenmustern ist die Elution und Sequenzierung einzelner Banden. Da sich in dieser Arbeit, wahrscheinlich aufgrund der größeren Geldicke von TGGE-Gelen, die Bandenelution aus TGGE-Gelen im Gegensatz zu der Elution aus DGGE- oder SSCP-Gelen (Øvreås *et al.*, 1997; Kowalchuk *et al.*, 1997; Schwieger & Tebbe, 1998) als schwierig erwies, wurde eine auf der Verwendung von Bis-Acryloyl-Cystamin beruhende Methode (mod. nach Muyzer *et al.*, 1998) angewandt. Hierdurch war es möglich, auch feine Banden aus TGGE-Gelen erfolgreich zu eluieren. Nach einer erneuten Amplifikation dieses Materials zeigten sich allerdings teilweise noch weitere Banden, wie auch bei Hengstmann & Liesack (1995) und Engelen (1998) beschrieben. Erklärt werden kann dieses Phänomen dadurch, daß die Eluate noch ausreichende Mengen an PCR-Produkten mit abweichenden Sequenzen aufweisen, da das Aufschmelzen und somit die Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit der Sequenzen im Gel ein statistischer Prozeß ist. Außerdem kann auch einzelsträngige DNA, die aufgrund ihres Migrationsverhaltens das Profil durchquert, für diesen Effekt verantwortlich sein (Engelen, 1998).

Insofern mußten vor einer Sequenzierung die Eluate zunächst kloniert werden. Für eine phylogenetische Zuordnung wurden die erhaltenen Partialsequenzen mit 16S rRNA Sequenzen aus Datenbanken verglichen. Allerdings ist die daraus abzuleitende Information über die physiologischen und ökologischen Eigenschaften der durch die Bande repräsentierten Arten in der Regel gering. Dies liegt zum einen daran, daß nur ein kleiner Teil der in der Natur vorkommenden Arten gut untersucht und gleichzeitig die 16S rRNA Sequenz in den zugänglichen Datenbanken hinterlegt ist (Pace, 1997). Zum anderen kann die Variabilität der vorhandenen physiologischen Diversität der Bakterien aufgrund der Konserviertheit der ribosomalen Gene nicht widerspiegelt werden (Fox *et al.*, 1992; Stackebrandt & Goebel, 1994). Für solche Fragestellungen sind Untersuchungen anhand von Reinkulturen erforderlich. Zudem können auf der TGGE nur relativ kleine Fragmente bis zu 500 Bp aufgetrennt werden (Myers *et al.*, 1985), was die Sequenzinformationen für eine phylogenetische Zuordnung der Banden begrenzt. Sasaki *et al.* (1997) konnten zwar zeigen, daß - mit Einschränkungen - eine Partialsequenzanalyse der 16S rDNA von 300 Bp eine Zuordnung bis zur Gattungsebene, teils auch bis zur Artebene erlaubt. Trotzdem sollten die Ergebnisse der Matrixkalkulation von Sequenzähnlichkeiten dieser Partialsequenzen nur als tendenzielle phylogenetische Einordnung angesehen werden (Vandamme *et al.*, 1996), zumal in dieser Arbeit häufig nur eine Einzelstrangsequenzierung eluierter Banden erfolgte.

Insofern ist eine Zuordnung von TGGE-Banden zu aus dem gleichen Habitat angelegten Klonbanken oder isolierten Reinkulturen sinnvoll. Um eine solche Zuordnung nicht nur durch den Vergleich des Migrationsverhaltens der entsprechend amplifizierten Sequenzen zu ermöglichen, bietet sich die Verwendung von Sonden an (Übersicht bei Muyzer & Smalla, 1998). Heuer & Smalla

(1997) und Felske *et al.* (1997) beschrieben die Anwendung von V6-Sonden an Umwelthabitaten. Hierbei bietet die hypervariable V6-Region der 16S rRNA den Vorteil, daß sie eine sehr hohe phylogenetische Variabilität aufweist und im Gegensatz zu anderen variablen Regionen der 16S rRNA von hochkonservierten Bereichen eng begrenzt wird (Heuer *et al.*, 1999). Dadurch können die Sonden ohne vorangehende Sequenzierung durch Verwendung universeller Primer mittels PCR hergestellt und gleichzeitig für die Detektion mit Digoxigenin markiert werden.

In einigen Fällen erwies sich die Spezifität der V6-Sonden allerdings als unzureichend, wie hier bei der Detektion von *P. putida*-Sequenzen, oder bei der Identifizierung von *Enterobacteriaceae* (Heuer *et al.*, 1999). Die Spezifität konnte jedoch deutlich gesteigert werden, wenn nach der Amplifikation die inkorporierten Primer und ihr Komplement enzymatisch entfernt wurden (Kap. 3.4; Heuer *et al.*, 1999). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Spezifitätsuntersuchungen zeigten, daß hierdurch Unterschiede von zwei oder mehr Basen in der V6-Region bei *Rubrivivax*-verwandten Sequenzen differenziert werden konnten, Unterschiede von nur einer Base bei *P. putida*-Sequenzen allerdings nicht. Die Anwendung dieser modifizierten und dadurch sehr spezifischen V6-Sonden wurde an Untersuchungen von Kartoffelrhizosphären demonstriert (Heuer *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe von modifizierten V6-Sonden und Vergleich des Laufverhaltens von PCR-Produkten von Klonsequenzen diesen Sequenzen Banden aus dem TGGE-Muster der Rhizoplane zugeordnet werden (Kap. 3.6.1).

#### 4.2. Anwendung der TGGE zur Darstellung bakterieller Gemeinschaften

Um zu ermitteln, inwieweit TGGE-Untersuchungen geeignet sind, bakterielle Gemeinschaften darzustellen, bietet sich ein Vergleich der mit der TGGE erzielten Ergebnisse mit denen anderer Methoden zur Untersuchung bakterieller Populationen an. Die hierzu durchgeführten TGGE-Analysen erfolgten in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen, die Untersuchungen von Rein-kulturen (DSMZ Braunschweig), Sequenzierungen von 16S rDNA-Fragmenten aus Klonbanken (Universität Bielefeld) sowie fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen mit molekularen Sonden (GSF Neuherberg) durchführten. Die Veröffentlichungen dieser Ergebnisse sind in Vorbereitung.

Im folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Projektpartner vergleichend zu den Ergebnissen der Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft der Luzernerhizoplane anhand der TGGE-Analyse (Kap. 3.6.1 und 3.6.2) dargestellt:

Die in Kap. 3.6.1 beschriebenen Untersuchungen der Luzernerhizoplane ergaben sowohl im DNA- als auch im RNA-TGGE-Muster eine starke Dominanz von *P. putida* Sequenzen, wobei drei der Banden allerdings offensichtlich auf Sequenzheterogenitäten eines Stammes zurückzuführen waren. Im RNA-Muster hatten diese drei Sequenzen zusammen einen relativen Anteil von 17,3%. Anhand der Kultivierungsergebnisse (DSMZ Braunschweig) konnte ebenfalls eine starke Dominanz von *P. putida* aufgezeigt werden: Von den kultivierbaren Bakterien machten  $\gamma$ -Proteobakterien mit 35% den größten Anteil aus, wobei innerhalb dieser Gruppe *P. putida*-Isolate den weitaus größten Anteil bildeten. Dies bestätigte sich auch in der Klonbank (Universität Bielefeld). Ca. 23% der Klonsequenzen konnten anhand von Hybridisierungen *P. putida* zugeordnet werden, wobei die Übereinstimmung dieser Klonsequenzen zu den *P. putida*-Banden in den TGGE-Mustern aufgezeigt werden konnte (Kap. 3.6.1).

Bei allen Untersuchungsmethoden dominierten proteobakterielle Sequenzen bzw. Isolate deutlich,



ebenso zeigten alle sequenzierten TGGE-Banden eine Zugehörigkeit zu den Proteobakterien. Bei den *in situ*-Hybridisierungen (GSF Neuherberg), den Isolaten und in der Klonbank konnten nach Sequenzen von  $\gamma$ -Proteobakterien hauptsächlich Sequenzen von  $\beta$ -Proteobakterien aufgezeigt werden, wobei alle näher untersuchten  $\beta$ -proteobakteriellen Klonsequenzen (insgesamt 18 Sequenzen) der *Rubrivivax gelatinosus*-Gruppe zuzuordnen waren. Übereinstimmend hierzu konnten auch einige TGGE-Banden dieser Gruppe zugeordnet werden, wie z.B. Bande 2a15 mit Verwandtschaft zu *Leptothrix discophora* (Abb. 14). Zudem konnte die Dominanz einer von fünf *Variovorax paradoxus*-verwandten Klonsequenzen aus der Klonbank eindeutig sowohl im RNA- als auch im DNA-TGGE-Muster aufgezeigt werden (Bande 2b12, Abb. 14). Je eine Klonsequenz der Klonbank mit Verwandtschaft zu *Burkholderia pickettii* (ms 9) und *Variovorax paradoxus* (ms 38) konnte je einer starken Bande im DNA-Muster anhand des Laufverhaltens zugeordnet werden (Abb. 13), was allerdings nur als Hinweis auf eine übereinstimmende Sequenz angesehen werden kann.

Bei den Isolaten zeigten die innerhalb der  $\beta$ -Proteobakterien dominierenden Isolate Verwandtschaft zu *Variovorax paradoxus*, *Zoogloea ramigera*, *Alcaligenes* und *Ralstonia* spp., wobei ebenfalls im TGGE-Muster die Sequenz einer Bande (2a11) Verwandtschaft zu *Zoogloea ramigera* aufwies. Zusätzlich zeigten zwei Banden (5a1 und 2a4) Verwandtschaft zu einer nicht näher eingeordneten Klonsequenz der  $\beta$ -Proteobakterien, der bei humanmedizinischen Untersuchungen beschrieben wurde (Dymock *et al.*, 1996). Bislang konnten allerdings noch keine, diesen beiden Banden entsprechenden Sequenzen in der Klonbank ermittelt werden.

$\alpha$ -Proteobakterien machten sowohl anhand der *in situ*-Hybridisierung, der Klonbank als auch bei den Isolaten nur einen geringeren Anteil aus, ebenso konnten nur zwei Banden aus dem TGGE-Muster hier zugeordnet werden (Bande 2a14 und 2b8). Beide Sequenzen zeigten Verwandtschaft zu der *Rhizobium-Agrobacterium* Gruppe, ebenso wie der Hauptteil der Isolate und Klonsequenzen der  $\alpha$ -Proteobakterien.

Bei der im folgenden Jahr durchgeführten Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaft der Rhizoplane bei einer Inokulation mit *S. meliloti* WT 2011 und L33 (Kap. 3.6.2) waren Vergleiche der mit den anderen Methoden dargestellten Diversität zu TGGE-Analysen nur sehr begrenzt möglich. Zum einen erfolgte die Untersuchung der Isolate nicht quantitativ, da der Schwerpunkt auf der Untersuchung von Kolonien mit verschiedenen Morphologien lag. Zum anderen wurde die in diesem Ansatz angelegte Klonbank der Universität Bielefeld durch Dot-Blot-Hybridisierungen mit verschiedenen Oligonukleotid-Sonden untersucht, wobei zur Zeit erst sehr wenige Sequenzierungsergebnisse vorliegen. Dadurch konnten vor Beendigung des Verbundprojektes noch keine Klonsequenzen gezielt einzelnen Banden des TGGE-Musters zugeordnet werden.

Mit allen Untersuchungsmethoden wurde deutlich, daß in dem Kontrollansatz die Dominanz der im Vorjahr ermittelten Sequenzen nicht erneut aufgezeigt werden konnte. So ergaben die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung als auch der Klonbank einen höheren Anteil an  $\beta$ -Proteobakterien, gefolgt von  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Proteobakterien. Bei der Charakterisierung des RNA-TGGE-Bandenmusters der Rhizoplane zeigte zudem mit drei Banden ein relativ hoher Anteil der sequenzierten Banden Verwandtschaft zu Sequenzen Gram-positiver Bakterien (Abb. 16). Ebenso wurden einige Isolate anhand von Partialsequenzierungen als Gram-positive Bakterien identifiziert. Im Rahmen der Untersuchung der Klonbank wurden keine Sonden zur Ermittlung Gram-positiver Sequenzen eingesetzt, so daß ein Vergleich nicht möglich war. Bei der bisher erfolgten Analyse einzelner 16S rDNA Sequenzen von Klonen, die keine Verwandtschaft zu denen von *Rhizobium* aufwiesen, konnten aller-

dings in allen Ansätzen einige Klonsequenzen mit Verwandtschaft zu Sequenzen Gram-positiver Bakterien aufgezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnten Gram-positive Bakterien bei der *in situ*-Hybridisierung nur in einem sehr geringen Anteil nachgewiesen werden.

Ansonsten konnten mit allen Methoden ähnliche Ergebnisse erzielt werden. So zeigte sich in den inokulierten Ansätzen eine sehr deutliche Zunahme an  $\alpha$ -proteobakteriellen Sequenzen sowohl in der Klonbank als auch bei der *in situ*-Hybridisierung, die fast ausschließlich mit der Sonde Rhi 1247 (Ludwig *et al.*, unveröffentlicht) hybridisierten und somit zu der Gruppe *Rhizobium* zugehörig waren. Daneben konnten keine weiteren signifikanten Veränderungen in den prozentualen Anteilen der untersuchten Gruppen durch eine Inokulation im Vergleich zum Kontrollansatz aufgezeigt werden, ebensowenig wie Unterschiede zwischen den beiden inokulierten Ansätzen. Diese sehr starke Dominanz der *Rhizobium*-Sequenzen in den inokulierten Ansätzen ist sehr wahrscheinlich auf die inokulierten *S. meliloti*-Stämme zurückzuführen. Es ist anzunehmen, daß durch die in diesem Versuchsansatz sehr intensive Behandlung der Wurzeln im Stomacher und Rühren in den Detergenzien (vgl. Kap. 2.2) *S. meliloti*-Bacteroide aus den Knöllchen freigesetzt wurden. Für diese Vermutung spricht, daß die Wurzeln der unbeimpften Kontrolle kaum Knöllchen aufwiesen, die Wurzeln der beimpften Ansätze dagegen gut noduliert waren. Zudem wurden anhand von laser-scanning-mikroskopischen Wurzeluntersuchungen in den inokulierten Ansätzen große Zellen mit ungewöhnlicher Morphologie in sehr großer Zahl nachgewiesen, die durch Hybridisierung mit einer für die Gattung *Sinorhizobium* spezifischen Sonde und der Verwendung von gegen *S. meliloti* gerichteter Antikörper als *S. meliloti*-Bacteroide identifiziert werden konnten (B. Mogge, persönliche Mitteilung).

Übereinstimmend hierzu konnten in den TGGE-Mustern der RNA und DNA in beiden inokulierten Ansätzen die deutliche Dominanz der *S. meliloti*-Sequenzen in der Rhizoplane aufgezeigt werden (Abb. 16). Daneben konnten bei Verwendung universeller Primer keine weiteren Veränderungen im Bandenmuster der Rhizoplane nachgewiesen werden. Zudem konnten ebenfalls keine Musterunterschiede zwischen den mit *S. meliloti* WT 2011 und L33 inokulierten Ansätzen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, daß sich der gentechnisch veränderte Stamm L33 bezüglich den Auswirkungen einer Inokulation auf die bakterielle Gemeinschaft genauso wie der Wildtypstamm verhält. Insofern konnten, wie erwartet, keine Auswirkungen der gentechnischen Veränderung an sich aufgezeigt werden.

Überraschend war die Detektion der TGGE-Bande W26 in der Rhizosphärefraktion des Kontrollansatzes, die nicht in den inokulierten Ansätzen der Rhizosphäre auftrat (Abb. 16). Die Sequenz dieser Bande zeigte Ähnlichkeit zu der 16S rDNA-Sequenz eines Cyanobakteriums, *Cylindrospermum sp.* (98,5%). Da diese Fraktion nur mit der TGGE untersucht wurde, kann nicht bestätigt werden, ob diese Änderung in der bakteriellen Gemeinschaft auch mit den anderen Methoden nachweisbar wäre. Zudem wurden in diesem Versuchsansatz keine parallelen Aufarbeitungen durchgeführt, so daß die Reproduzierbarkeit dieses Musters nicht untersucht werden konnte. Insofern sollte diese Veränderung im Muster nur unter Vorbehalt gesehen werden, zumal weder in der Boden- noch in der Rhizoplanefraktion, abgesehen von der Detektion des inokulierten Stammes, mit universellen Primern Veränderungen durch eine Inokulation aufgezeigt werden konnten.

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen eine hohe Übereinstimmung der mit der TGGE erhaltenen Ergebnisse im Vergleich zu denen der anderen Methoden. Obwohl die DNA-Extrakte,

die für die TGGE-Analysen verwendet wurden, nach einem etwas anderen Protokoll extrahiert und aufgereinigt wurden als die DNA zur Herstellung der Klonbank, zeigten die jeweiligen Amplifikate auf der TGGE ein nahezu identisches Muster, was auf ein ähnliches Spektrum an aufgeschlossenen Zellen hindeutet. In beiden Fällen wurden die Nukleinsäuren mittels eines Bead-beaters extrahiert und vor der Analyse einer PCR unterzogen. Ähnlich gute Übereinstimmungen zwischen dominanten Sequenzen einer aus demselben Habitat angelegten Klonbank und starken T-/DGGE-Banden sind von Ferris & Ward (1997), Zoetendahl *et al.*, (1998) und Nüsslein & Tiedje (1998) beschrieben worden, wobei in diesen Arbeiten die Nukleinsäuren für T-/DGGE-Analysen und die Erstellung einer Klonbank in identischer Weise gewonnen wurden. Dagegen sind mehrfach deutliche Abweichungen in der durch T-/DGGE-Analysen und der durch kultivierbare Bakterien beschriebenen Diversität der bakteriellen Gemeinschaft in Wurzelassoziation ermittelt worden (Heuer & Smalla, 1997; Duineveld *et al.*, 1998). Daß in diesem Verbundprojekt die Ergebnisse der Untersuchung der Isolate, soweit sie quantifiziert wurden, mit der TGGE und den anderen Methoden übereinstimmten, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß mit zunehmender Nähe zur Wurzeloberfläche das Nährstoffangebot erhöht ist und dadurch die Kultivierbarkeit der Rhizoplanebakterien zunimmt (van Elsas *et al.* 1998). Zudem sind sehr viele verschiedene Medien verwendet worden, die das Nährstoffangebot der Rhizoplane gut erfassen.

Jede der in diesem polyphasischen Ansatz verwendeten Methoden hat eigene Limitierungen und Fehlerquellen (Referenzen bei Wintzingerode *et al.*, 1997; Buchholz-Cleven *et al.*, 1997; Muyzer & Smalla, 1998; Fuchs *et al.*, 1998). Aufgrund der guten Übereinstimmung der Resultate kann aber davon ausgegangen werden, daß die in dem Verbundprojekt erhaltenen Ergebnisse die tatsächliche Zusammensetzung der dominanten Sequenzen in der bakteriellen Gemeinschaft der Luzernerhizoplane sehr gut beschreiben. Zudem bestätigen diese Untersuchungen die Annahme, daß unter den hier angewendeten Bedingungen die mit der TGGE erzeugten Muster die Diversität der dominanten Sequenzen einer bakteriellen Gemeinschaft reflektieren können.

#### **4.2.1 Limitierungen der TGGE-Analyse**

- **Limitierungen bei der Darstellung bakterieller Gemeinschaften**

Obwohl durch die TGGE-Analysen charakteristische Bandenmuster oder auch „Fingerabdrücke“ einer bakteriellen Gemeinschaft erhalten werden können, ist bei der Interpretation einzelner Bandenmuster jedoch zu berücksichtigen, daß das TGGE-Muster an sich eine mit Fehlern behaftete Darstellung der bakteriellen Gemeinschaft des entsprechenden Habitates ist, wie nachfolgend dargestellt wird.

### - Extraktionsmethode

Wie in Kap. 3.1 gezeigt wurde, beeinflußt die Art des Extraktionsverfahrens von Nukleinsäuren die Musterausbildung auf der TGGE maßgeblich. Die verschiedenen DNA-Extraktionsverfahren, soweit sie bei den hier vorliegenden Bodenproben überhaupt zu amplifizierbarer DNA führten, zeigten je nach Protokoll auf der TGGE sehr stark abweichende Muster (s. Abb. 2), was auf ein unterschiedliches Spektrum an aufgeschlossenen Bakterien schließen läßt. Aus diesem Grund wurde zu Beginn dieser Arbeit ein bereits beschriebenes Extraktionsverfahren (Felske *et al.*, 1996) so modifiziert, daß es bei den hier vorliegenden Umweltproben sowohl für die Analyse der DNA als auch der RNA erfolgreich angewendet werden konnte. Hierbei bietet dieses Protokoll den Vorteil, RNA und DNA parallel zu extrahieren, so daß ein Einfluß der Extraktionsmethode auf die Musterbildung bei einem Vergleich der DNA und RNA-Muster weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Obwohl der in dieser Arbeit durchgeführte Zellaufschluß mittels eines Bead-beaters als relativ effiziente Methode angesehen wird (Moré *et al.*, 1994; Felske *et al.*, 1996; van Elsas *et al.*, 1997), ist auch hierbei sicherlich nur ein begrenztes Spektrum an Mikroorganismen aufgeschlossen worden. So konnten Felske *et al.* (1996) bei dem hier durchgeführten Zellaufschluß zwar den problemlosen Aufschluß sowohl Gram-negativer als auch Gram-positiver Bakterien aufzeigen, andererseits beschreibt Bakken (1997), daß bei einem Bead-beater Aufschluß kleine Zellen nur begrenzt aufgeschlossen werden.

### - PCR

Neben der Selektivität des Extraktionsverfahrens sind auch Verschiebungen durch die für die TGGE-Analyse notwendige Amplifikation der Nukleinsäuren in der PCR oder RT-PCR zu berücksichtigen, die ebenfalls Auswirkungen auf die TGGE-Musterbildungen haben können (Muyzer & Smalla, 1998). Zum Beispiel führen verschiedene Polymerasen zu unterschiedlichen Musterbildungen (s. Kap. 3.6.4). In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene reverse Transkriptasen verwendet, die unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber mitextrahierten Hemmstoffen aufwiesen. Die jeweils daraus resultierenden TGGE-Muster wurden anhand von Clusteranalysen, getrennt nach verwendeter Polymerase, verglichen, wobei sich vergleichbare Ähnlichkeitsverhältnisse der einzelnen Muster untereinander ergaben (vgl. Abb. 30c mit Abb. 31). Die Verwendung der verschiedenen reversen Transkriptasen bei der Amplifikation derselben rRNA-Extrakte führte allerdings zu Verschiebungen in den einzelnen TGGE-Mustern (Abb. 29) und somit zu einer unterschiedlichen Darstellung von Zielsequenz-Häufigkeiten in einem Muster.

Bei der PCR kann es zudem zu der Bildung von Artefakten wie Chimärenbildung, Deletionen bedingt durch stabile Sekundärstrukturen oder auch zum fehlerhaften Einbau von Basen durch die Polymerasen kommen (Übersicht bei v. Wintzingerode *et al.*, 1997). Außerdem kann es bei der Amplifikation der für die TGGE-Analysen notwendigen GC-Klammern zu unvollständigen Synthesen dieser G+C-reichen Regionen kommen, die in der nachfolgenden TGGE-Analyse zu der Bildung von multiplen Banden einer Zielsequenz führen können (Nübel *et al.*, 1996).

Daneben kann es zu selektiven oder auch präferentiellen Amplifikationen einzelner Zielsequenzen kommen, bedingt durch unterschiedliche Primereffizienzen (Übersicht bei v. Wintzingerode *et al.*, 1997) oder durch unterschiedlich hohe G+C-Gehalte der Zielmoleküle (Reysenbach *et al.*, 1992).

Suzuki & Giovannoni (1996) konnten zudem präferentielle Amplifikationen nachweisen, die durch unterschiedliche Ausgangskonzentrationen in den Zielsequenzen bedingt wurden, jedoch durch Reduzierung der Zykluszahl in der PCR verringert werden konnten. Allerdings vermuten die Autoren, daß diese Selektionierungen in DNA-Extrakten aus Umweltproben mit einer hohen Sequenzdiversität nur sehr begrenzt auftreten. Wie beispielhaft in Abb. 3 gezeigt wurde, konnte bei den in dieser Arbeit untersuchten RNA- und DNA-Extrakten keine Verschiebung in den TGGE-Mustern bei verschiedenen Zykluszahlen und Verdünnungsstufen der Extrakte nachgewiesen werden. Dies galt sowohl bei der Verwendung der universellen Primer als auch bei der Anwendung des spezifischen Primers R1463, obwohl hierbei die Zielsequenzdiversität erheblich reduziert wurde. Insofern konnte hier eine präferentielle Amplifikation, wie sie durch den Vergleich von TGGE-Mustern nach verschiedenen PCR-Zykluszahlen (Zoetendahl *et al.*, 1998) und verschiedenen Verdünnungen der Zielsequenzen (Heuer & Smalla, 1997) dargestellt werden kann, in dieser Arbeit nicht aufgezeigt werden.

Ebenso ist die Bildung von Heteroduplices (Myers *et al.*, 1989; Jensen & Straus, 1993) bekannt. Obwohl die Heteroduplexbildung, die bei der Charakterisierung einiger DGGE-Muster nachgewiesen werden konnte (Ferris *et al.*, 1997), die Interpretation der resultierenden TGGE-Muster durch eine größere Anzahl detektierbarer Banden erschwert, gehen Murray *et al.* (1996) davon aus, daß die Heteroduplexbildung bei der DGGE- (und damit vergleichbar auch der TGGE-) Analyse von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften kein signifikantes Problem ist. Übereinstimmend hierzu konnte bei keiner der in dieser Arbeit durchgeführten Charakterisierungen der TGGE-Muster eine Heteroduplexbildung aufgezeigt werden. Dies schließt allerdings das Auftreten von Heteroduplices nicht aus, da nur ein Teil der Muster näher charakterisiert wurde. Das Vorliegen von Heteroduplices hätte sich nach der Elution und Klonierung von Banden bei dem anschließenden Klonscreening auf der TGGE in Form von mehreren Banden einer Klonsequenz gezeigt (Ferris & Ward, 1997).

#### - Besonderheiten der Zielsequenzen

Neben diesen PCR-bedingten möglichen Fehlerquellen sind auch Besonderheiten der Zielsequenzen zu berücksichtigen, da die Organisation der rDNA in den Bakteriengenomen (*rrn*-Operone) Auswirkungen auf das resultierende Nukleinsäureprofil im TGGE-Gel haben kann. Die *rrn*-Operone kommen bei den verschiedenen Prokaryoten in unterschiedlicher Anzahl vor (Cole & Giron, 1994), so daß dies zu einer Fehleinschätzung des quantitativen Vorkommens einzelner Spezies nach Amplifikation der rDNA aus Umweltproben führen kann. So beschrieben Farrelly *et al.* (1995) Auswirkungen der Genomgröße und der Anzahl der 16S rRNA-Gene innerhalb eines Genoms auf die Quantität der PCR-Produkte. Daneben können die einzelnen Operone eines Genoms aber auch Sequenzunterschiede aufweisen (Rainey *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997). Daß diese Sequenzheterogenitäten der 16S rRNA-Gene auch qualitative Effekte auf das TGGE-Muster haben, wurde erstmals von Nübel *et al.* (1996) anhand einer Reinkultur von *Paenibacillus polymyxa* (DSM 36) nachgewiesen. In neuerer Zeit wurden bei einer ganzen Reihe weiterer Organismen Sequenzheterogenitäten in 16S rRNA-Genen nachgewiesen, die anhand der TGGE aufgezeigt werden können (S. Meier-Bethke, persönliche Mitteilung; Felske *et al.*, 1999; s. auch diese Arbeit).

- Auflösungsvermögen der TGGE

Daneben führen aber auch Unzulänglichkeiten der TGGE-Methode an sich dazu, daß die in einem Habitat vorliegende Diversität nur reduziert dargestellt werden kann.

Wie in Kap. 3.5 beschrieben, bilden einige Sequenzen auf der TGGE keine distinkten Banden, sondern nur eine mehr oder weniger diffuse Schwärzung („Wolke“). Dies kann dazu führen, daß, selbst wenn einzelne Sequenzen in einer Mischpopulation so stark amplifiziert werden, daß sie prinzipiell auf der TGGE detektierbar wären, sie aufgrund der unspezifischen Bandenbildung nicht als Sequenzen erfaßt werden, da sie sich nicht von der Hintergrundfärbung einer Gelspur abheben.

Analysen des Schmelzverhaltens anhand der *POLAND*-Software deuten darauf hin, daß die Lage einer relativ kleinen Schmelzdomäne (kleiner als 50 Bp) nahe der GC-Klammer dieses auffällige Laufverhalten bedingt. Wu *et al.* (1998) führten dieses Laufverhalten ebenfalls auf das Vorliegen einer Schmelzdomäne nahe der GC-Klammer zurück, die allerdings mehr als 50 Bp aufwies. Dem gegenüber steht der Befund, daß die Sequenz ms 34, deren Schmelzdomäne nahe der GC-Klammer mehr als 50 Bp lang war, eine distinkte Bandenbildung zeigte, so daß hier keine übereinstimmende Erklärung gefunden werden konnte. Wie in Untersuchungen von Wu *et al.* (1998) führte zudem das Vorliegen einer relativ flachen und langen Schmelzdomäne, die mehr als 100 Bp lang war und deren Temperaturunterschied zu benachbarten Domänen weniger als 1°C betrug (Sequenz ms 35), ebenfalls zu einer unspezifischen Bandenbildung. Zur Zeit kann allerdings noch nicht erklärt werden, warum diese Sequenzcharakteristika eine unspezifische Bandenbildung verursachen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Veränderungen der TGGE-Laufbedingungen durch veränderte Temperaturgradienten oder Laufzeiten beeinflussten das Laufverhalten nicht (nicht dargestellt). Obwohl in Einzelfällen das Schmelzverhalten von Sequenzen durch Veränderungen der Primersequenzen (Einbau von GC- oder AT-reichen Sequenzen) so geändert werden konnte, daß eine distinkte Bandenbildung erfolgte (Wu *et al.*, 1998), sind solche Modifizierungen bei der Analyse von Sequenzpopulationen, wie sie in Umweltproben vorliegen, nur bedingt durchführbar. Bei diesen Analysen werden universelle oder gruppenspezifische Primer benutzt, deren Modifizierung zu einer veränderten Spezifität führen könnte.

Neben der unspezifischen Bandenbildung schränkt auch das Auflösungsvermögen der TGGE die darstellbare Diversität ein. Obwohl das Auflösungsvermögen bei TGGE-Analysen durch die Verwendung von GC-Klammern deutlich gesteigert werden konnte (Myers *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1989) und hierdurch durchaus Sequenzunterschiede von nur einer Base detektiert werden konnten (Nübel *et al.*, 1996), ist mehrfach beschrieben worden, daß bestimmte DNA-Fragmente mit abweichenden Sequenzen anhand des Laufverhaltens auf der T-/DGGE nicht unterscheidbar sind (Vallaey *et al.*, 1997; Heuer & Smalla, 1997; Jensen *et al.*, 1998; s. auch diese Arbeit).

Aufgrund der limitierten Trennstrecke der TGGE kann zudem nur eine begrenzte Anzahl von Sequenzen mit unterschiedlichen Migrationsverhalten prinzipiell dargestellt werden. In den hier durchgeführten Analysen von Umweltproben mit universellen Primern konnten bis zu 50 Sequenzen mit unterschiedlichem Laufverhalten in einer Gelspur aufgezeigt werden. Demgegenüber schätzen Torsvik *et al.* (1990), daß in einer Bodenprobe mehr als 4000 verschiedene Genome vorliegen. Mehrere Studien legen nahe, daß nur bakterielle Populationen, die mehr als 1% der gesamten bakteriellen Gemeinschaft ausmachen, bei T-/DGGE Analysen mit universellen 16S rDNA-Primern erfaßt werden können (Muyzer *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 1996). Ähnliche Werte wurden

von Lee *et al.* (1996) bei der Untersuchung von Umweltproben mittels SSCP gefunden.

Dadurch werden viele und möglicherweise auch ökologisch wichtige Arten nicht erfaßt. Mit Hilfe von TGGE-Analysen von Anreicherungskulturen (Jensen *et al.*, 1998) oder spezifischen Primern können jedoch auch weniger abundante Gruppen amplifiziert und auf der T-/DGGE dargestellt werden. So wurden spezifische Primer für  $\beta$ -proteobakterielle Ammoniumoxidierer (Kowalchuk *et al.*, 1997), Cyanobakterien (Nübel *et al.*, 1997), *Thiomicrospira*-Spezies (Brinkhoff & Muyzer, 1997), Actinomyceten (Heuer *et al.*, 1997), oder wie in dieser Arbeit für Sinorhizobien und verwandte Sequenzen entwickelt.

- **Limitierungen bei dem Vergleich von TGGE-Mustern**

Da die eben genannten Limitierungen Auswirkungen auf die Musterbildung haben, sollte bei einem Mustervergleich der Einfluß von Faktoren, welche unabhängig von jenen Veränderungen, die durch die zu untersuchenden Beeinflussungen hervorgerufen werden, zu veränderten TGGE-Bandenmustern führen, weitestgehend ausgeschlossen werden. So beschreibt u. a. Engelen (1998) die Notwendigkeit, die Entnahme von Bodenproben – wie sie hier erfolgte – in Form von Sammelproben durchzuführen, da inhomogene Verteilungen der Mikroorganismen aufgrund der relativ uneinheitlichen Struktur des Bodens bei der Probenahme in Form von Einzelproben zu stark abweichenden TGGE-Mustern führten. Ebenso kann die Art der Probenzwischenlagerung (Rochelle *et al.*, 1994) und das Extraktionsverfahren (diese Arbeit; Muyzer & Smalla, 1998) Auswirkungen auf die gewonnenen Nukleinsäureextrakte haben. Da alle in dieser Arbeit ausgewerteten Proben in der gleichen Weise gelagert und mit demselben Extraktionsprotokoll gewonnen wurden, ist davon auszugehen, daß die hierbei auftretenden Selektionierungen alle Proben in vergleichbarem Ausmaß betrafen, so daß ein Vergleich dieser Proben mittels Clusteranalysen durchgeführt werden konnte. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß aufgrund der Selektivität des Extraktionsverfahrens Änderungen in bakteriellen Gemeinschaften nicht detektiert werden können, wenn sie Bakterien betreffen, die nicht aufgeschlossen werden können. Weiterhin wurden alle jeweils miteinander verglichenen Proben mit den gleichen Polymerasen und unter denselben, in dieser Arbeit modifizierten Reaktionsbedingungen amplifiziert. Zudem wurde die Reproduzierbarkeit des Extraktionsverfahrens sowie der PCR- und RT-PCR-Produkte dadurch untersucht, daß sowohl unabhängige parallele Aufarbeitungen als auch dieselben Aufarbeitungen mehrfach amplifiziert und auf der TGGE aufgetragen wurden. Alle hieraus resultierenden Muster zeigten eine sehr hohe Reproduzierbarkeit. Insofern waren die hierbei möglicherweise auftretenden Limitierungen konstant, was den Vergleich der TGGE-Muster ermöglicht (Øvreås *et al.*, 1997; Teske *et al.*, 1998).

Aber auch wenn unter den hier vorliegenden Bedingungen die Vergleichbarkeit der TGGE-Muster gewährleistet erscheint, haben einige der dargestellten Limitierungen nicht nur Auswirkungen auf die Interpretation eines Musters, sondern auch auf die Darstellungen von Beeinflussungen bakterieller Gemeinschaften durch den Vergleich von TGGE-Mustern. Als Beispiel sei die Sequenzheterogenität und das Vorkommen eines identischen Migrationsverhaltens unterschiedlicher Sequenzen genannt. So kann bei der Untersuchung von Umweltproben die mit der Ausbildung von mehreren TGGE-Banden verbundene Sequenzheterogenität eines Stammes in gewisser Weise ein höhere Diversität vorspiegeln. Felske *et al.* (1998, 1999) vermuten jedoch, daß Sequenzheterogenitäten das TGGE-Muster von Umweltproben nur wenig beeinflussen. Dies steht allerdings im

Widerspruch zu den Ergebnissen in dieser Arbeit: Sowohl bei der Charakterisierung der Rhizoplane fraktion der in Kap. 3.6.1 dargestellten Untersuchung als auch bei der im nachfolgenden Jahr durchgeführten Charakterisierung des Bandenmusters (Kap. 3.6.2) konnten Sequenzheterogenitäten aufgezeigt werden, die das Bandenmuster maßgeblich beeinflussten. Im ersten Fall zeigten drei für die Fraktion der Rhizoplane charakteristische Banden im TGGE-Muster hohe Sequenzähnlichkeiten zu *Pseudomonas putida*, wobei das Vorliegen einer Sequenzheterogenität durch TGGE-Analysen von aus demselben Habitat isolierten Reinkulturen bestätigt werden konnte. Auch die inokulierten Stämme *S. meliloti* WT 2011 und L33 ließen eine Sequenzheterogenität anhand der Bildung von zwei Banden auf der TGGE erkennen (Abb. 15); allerdings konnten diese Heterogenitäten nur bei Verwendung des Primerpaares F984-GC/R1346 aufgezeigt werden. Mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 dagegen zeigten die Amplifikate der Reinkulturen nur eine Bande (Abb. 26, Spur S), da hier die Sequenzunterschiede in den 16S rRNA-Genen offensichtlich nicht zu einem veränderten Schmelzverhalten führten. Es ist anzunehmen, daß das Laufverhalten der *S. meliloti* Sequenzen, die mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 amplifiziert wurden, durch eine durch die Verlängerung des Produktes hinzukommende Schmelzdomäne beeinflusst wurde, die das Fragment 968-1346 nicht aufwies.

Ein Vergleich der entsprechenden RNA- und DNA-TGGE-Muster zeigte, daß die durch die Sequenzheterogenitäten von *P. putida* und *S. meliloti* hervorgerufenen multiplen Banden im DNA- und RNA-Muster ungefähr in gleicher Stärke auftraten (Abb. 13, 15). Dies deutet einerseits auf die Expression der mit der TGGE auftrennbaren 16S rDNA-Genvarianten *in situ* hin (Nübel *et al.*, 1996), andererseits bedeutet es auch, daß die Möglichkeit der Beeinflussung des TGGE-Bandenmusters durch Sequenzheterogenitäten bei der Interpretation der DNA- und auch der RNA-Muster berücksichtigt werden muß.

Bei den hier durchgeführten Clusteranalysen wurden die Bandenmuster mit Ausnahme der mit dem Primer R1463 erzeugten Muster, auf die weiter unten näher eingegangen wird, nicht näher charakterisiert. Insofern kann nicht abgeschätzt werden, inwieweit Organismen mit Sequenzheterogenitäten zu den Musterverschiebungen beigetragen haben. Bei dem in Kap. 3.6.3 beschriebenen Versuchsansatz, bei dem das Ausmaß der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaften anhand von Mustervergleichen ermittelt wurde, konnten nur in der Rhizoplane fraktion des FAL-Bodentyps TGGE-Banden ausgemacht werden, die ein identisches Laufverhalten zu *S. meliloti* aufwiesen und die in den inokulierten Ansätzen eine größere Intensität aufwiesen (Abb. 22). Insofern beeinflusste höchstens in dieser Versuchsvariante die Sequenzheterogenität des Inokulums das Ausmaß der anhand der Clusteranalyse ermittelten Verschiebungen im Bandenmuster. Abgesehen von diesen Musterveränderungen wurden in dieser Versuchsvariante jedoch noch weitere Banden durch eine Inokulation deutlich in ihrer Intensität beeinflusst, und zwar in einem stärkeren Ausmaß als im STM-Bodentyp (Abb. 22). Daher ist anzunehmen, daß hier die Sequenzheterogenität von L33 nur einen relativ geringen Einfluß auf die ermittelten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsvarianten hatte.

Eine andere Problematik ergibt sich aus der Tatsache, daß DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Sequenzen ein identisches Migrationsverhalten aufweisen können. Dies führt dazu, daß die Diversität und ebenso mögliche Änderungen in der bakteriellen Gemeinschaft nur in begrenztem Maße beobachtet werden können (Vallaeys *et al.*, 1997). Besondere Bedeutung hat dies, wenn spezifische Primer verwendet werden, da hierdurch die Komplexität des Bandenmusters reduziert wird (s. Kap.



3.6). Ebenso weisen dadurch, daß nur einzelne Gruppen der bakteriellen Gemeinschaft erfaßt werden, diese Sequenzen eine größere Ähnlichkeit untereinander auf. Unter der Hypothese, daß die Möglichkeit der Differenzierung anhand des Laufverhaltens auf der TGGE mit abnehmender Größe der Sequenzunterschiede kleiner wird, führt dies zu einer weiteren Verringerung der darstellbaren Diversität. Unterstützt wird dies durch mehrere Arbeiten, bei denen es nicht möglich war, nahe verwandte Sequenzen anhand des Laufverhaltens auf der T-/DGGE zu differenzieren (Kap. 3.2.2; Buchholz-Cleven *et al.*, 1997; Kowalchuk *et al.*, 1997, Stephen *et al.*, 1998). Aufgrund dieser wahrscheinlich nur begrenzten Auflösung ist eine Clusteranalyse von TGGE-Mustern, die mit spezifischen Primern erzeugt wurden, ausschließlich anhand des Vergleichs des Laufverhaltens problematisch.

Die Notwendigkeit einer vorherigen Charakterisierung sei im folgenden anhand der Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaft der Luzernerhizoplane im FAL-Boden bei Verwendung des spezifischen Primers R1463 dargestellt (Kap. 3.6.3). Die aus der mit *S. meliloti* L33 inokulierten Versuchsvariante stammende Bande 4 und die aus der nicht-inokulierten Versuchsvariante stammende Bande 5 wiesen ein sehr ähnliches Migrationsverhalten auf. Die Sequenzanalyse ergab allerdings, daß die eluierten Sequenzen AF4 und AF5 aus diesen beiden Banden unterschiedliche Sequenzen aufwiesen (Abb. 26). Zusätzlich wurden noch weitere Klone dieser eluierten Banden untersucht (nicht gezeigt). So wurde ein weiterer Klon des Eluates der Bande 5 sequenziert, wobei dieselbe Sequenz wie AF5 ermittelt wurde (Ähnlichkeit zu *R. leguminosarum* 98,5%). Von dem Eluat der Bande 4 wurden insgesamt vier Klonsequenzen mit identischem Migrationsverhalten untersucht. Davon ergaben drei Sequenzen eine Ähnlichkeit zu *S. meliloti* von 100% (unter anderem auch AF4) und eine Sequenz wies eine Ähnlichkeit zu *R. leguminosarum* von 100% auf. Dies zeigt, daß zumindest die Bande 4 nicht durch eine Sequenz charakterisiert wird, sondern daß verschiedene Sequenzen zu der Ausbildung dieser Bande beigetragen haben. Der Umfang der durchgeführten Sequenzierungen von Klonen eluierter Banden war zwar nicht ausreichend, um die Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen Sequenzen zu ermitteln, die eine Bande charakterisieren. Dadurch, daß die Eluate vor der Klonierungs-PCR jedoch verdünnt wurden (s. Kap. 2.6.3, 2.6.4) kann angenommen werden, daß diejenigen Sequenzen, die am stärksten zu der Ausprägung der Bande beigetragen haben, erfaßt wurden (Jensen *et al.*, 1998).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, daß möglicherweise die beiden Banden 4 und 5 dieselben Sequenzen, wenn auch in verschiedenen Häufigkeiten, aufweisen. Da jedoch keine zu AF5 übereinstimmende Sequenz in den Eluaten der Bande 4 nachgewiesen werden konnte, ist zu vermuten, daß diese Sequenz durch die Inokulation mit *S. meliloti* L33 verdrängt wurde. Um die Auswirkungen einer möglichen Falschzuordnung von Banden bei einer Clusteranalyse zu verdeutlichen, wurde eine Clusteranalyse auf Grundlage des Vergleichs des Laufverhaltens durchgeführt, wobei die Banden 4 und 5 zu demselben Bandentyp zugeordnet wurden. Es ergab sich eine relativ hohe Musterverwandtschaft von 0,7. Wurden dagegen die Banden 4 und 5 verschiedenen Bandentypen zugeordnet, so war die Musterverwandtschaft deutlich geringer (relative Ähnlichkeit der Muster: 0,39; s. Abb. 27). Dies zeigt, daß unter Umständen eine Clusteranalyse Veränderungen in der bakteriellen Gemeinschaft nur begrenzt erfaßt, wenn die Bandenmuster, die aus der Verwendung von spezifischen Primern resultieren, nicht näher charakterisiert werden. Insofern ist bei diesen Analysen eine nähere Charakterisierung einzelner Banden durch Anwendung spezifischer Sonden (wie z.B. bei Stephen *et al.*, 1998) oder wie in dieser Arbeit durch Sequenzierung sinnvoll. Um alle erfaßbaren Veränderungen einer bakteriellen Gemeinschaft an-

hand der TGGE auch tatsächlich aufzeigen zu können, hätten sicherlich alle Banden näher charakterisiert werden müssen. In dieser Arbeit wurden allerdings nur stichprobenartig einzelne Banden sequenziert, so daß nicht auszuschließen ist, daß Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsvarianten möglicherweise nicht im vollen Ausmaß erfaßt wurden.

Aufgrund der dargestellten Limitierungen wird deutlich, daß die durch die TGGE darstellbare Diversität eingeschränkt ist, so daß die ermittelten Ähnlichkeiten der Muster nur als relative Ähnlichkeiten zu interpretieren sind (Vallaeys *et al.*, 1997; Eichner *et al.*, 1999). Dies führt zu mehreren Konsequenzen, die bei einer Clusteranalyse von TGGE-Mustern berücksichtigt werden müssen:

- Bei der Ermittlung der Auswirkung eines bestimmten Einflusses auf die bakterielle Gemeinschaft müssen alle zu vergleichenden Proben in identischer Weise aufgearbeitet werden. Die aus den einzelnen unabhängigen Wiederholungen der Versuchsvarianten resultierenden TGGE-Muster sollten dabei eine hohe Kongruenz aufweisen, da die Reproduzierbarkeit der Muster die Sensitivität der Clusteranalyse maßgeblich beeinflusst.
- Clusteranalysen ausschließlich anhand des Laufverhaltens sollten nur bei relativ komplexen Mustern durchgeführt werden, wie in dieser Arbeit von Boden, Rhizosphäre und Rhizoplanehabitaten bei Verwendung universeller Primer, da hier mögliche Falschzuordnungen nur eine begrenzte Auswirkung auf die ermittelten Ähnlichkeiten haben.
- Bei der Analyse von komplexen Mustern erwies sich eine Clusteranalyse als sinnvoll, wenn die Muster einen gewissen Grad an Übereinstimmung aufwiesen, da hierdurch die Bandenzuordnung anhand des Laufverhaltens erleichtert wurde.
- Bei der Interpretation der ermittelten relativen Ähnlichkeiten ist zu berücksichtigen, daß letztlich nur die TGGE-Muster verglichen wurden. Anhand der genannten Limitierungen wird deutlich, daß wahrscheinlich nur ein Teil der Veränderungen in bakteriellen Gemeinschaften durch bestimmte, z.B. anthropogene Beeinflussungen auf der TGGE dargestellt werden kann. Allerdings kann angenommen werden, daß Veränderungen in den TGGE-Bandenmustern auf Beeinflussungen der bakteriellen Gemeinschaft hindeuten (Øvreås *et al.*, 1997; Ferris & Ward, 1997).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß mit der TGGE in relativ einfacher und schneller Weise eine Darstellung der bakteriellen Gemeinschaft erfolgen kann, so daß diese Methode gut geeignet ist, um die Dynamik oder auch Beeinflussungen von bakteriellen Gemeinschaften durch verschiedene Faktoren aufzuzeigen. Auch wenn die TGGE-Muster mit Fehlern behaftete Darstellungen der bakteriellen Gemeinschaften sind, kann dennoch angenommen werden, daß mit dieser Methode die dominanten Sequenzen in einer bakteriellen Gemeinschaft reflektiert werden können (Kap. 4.2; Ferris & Ward, 1997; Muyzer & Smalla, 1998) und zudem unterschiedlich starke Veränderungen in den Bandenmustern auch auf unterschiedlich starke Beeinflussungen der bakteriellen Gemeinschaften hindeuten (Eichner *et al.*, 1998; Engelen *et al.*, 1998). Aufbauend auf der letztgenannten Vermutung wurden auch in dieser Arbeit TGGE-Muster verglichen, um das unterschiedliche Ausmaß von Veränderungen in bakteriellen Gemeinschaften durch verschiedene Faktoren darzustellen (Kap. 4.3).

#### **4.3 Diskussion der Gewächshausversuche: Darstellung von Veränderungen in bakteriellen Gemeinschaften anhand von TGGE-Analysen**

Die TGGE-Mustervergleiche der bakteriellen Gemeinschaften der in dieser Arbeit untersuchten Pflanzenarten Luzerne, Roggen, Bohne und Klee ergaben eine deutliche Veränderung der Gemeinschaften vom Boden über die Rhizosphäre zur Rhizoplane der jeweiligen Pflanzen, wie sie auch von Lemanceau *et al.* (1995) an Flachs- und Tomatenhabitaten anhand von Kultivierungsuntersuchungen beschrieben wurden. Vor allem im Boden, aber auch noch in der Rhizosphäre traten überwiegend zahlreiche schwache TGGE-Banden auf, wogegen sich in der Rhizoplanefraktion fast alle Banden durch eine deutlich höhere Intensität auszeichneten, während gleichzeitig die Anzahl der Banden abnahm. Diese Unterschiede konnten bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsansätzen aufgezeigt werden, auch wenn die Anzuchtbedingungen im Fall der Luzernepflanzen durch die Verwendung unterschiedlich großer Mikrokosmen und Verlängerung der Wachstumszeit von 6 auf 10 Wochen verändert waren (Kap. 3.6.). Hiermit übereinstimmend beschrieben Marilley *et al.* (1998) eine Verringerung der mikrobiellen Diversität in an Pflanzenwurzeln assoziierter Habitate im Vergleich zum Boden anhand von PCR-Restriktionsanalysen von 16S rDNA-Fragmenten. Daneben zeigten einige TGGE-Banden mit gleichem Laufverhalten vom Boden über den Wurzelboden und Rhizosphäre zur Rhizoplane hin eine veränderte Intensität (beispielhaft für Luzerne s. Abb. 11, 20). Dies kann in Übereinstimmung zu Mahaffe & Kloepper (1997) als ein Hinweis auf das Vorkommen gleicher Sequenzen mit unterschiedlicher Abundanz in den verschiedenen Habitaten angesehen werden. Die Autoren schlossen aufgrund des Auffindens übereinstimmender Isolate in unterschiedlichen Abundanzen auf ein Kontinuum innerhalb der Habitate Boden, Rhizosphäre und Endorhizosphäre von Gurken.

Die im Rahmen des Verbundprojekts erzielten Ergebnisse der Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft der Luzerne bestätigten prinzipielle Unterschiede in den Habitaten. So ergaben die Untersuchungen der kultivierbaren aeroben Bakterien (DSMZ Braunschweig), daß die Anzahl der Gram-positiven Isolate im Boden und der Rhizosphäre deutlich gegenüber der Rhizoplane erhöht war, wogegen der prozentuale Anteil an Proteobakterien vom Boden über die Rhizosphäre zur Rhizoplane zunahm. Auch in den Klonbanken (Universität Bielefeld) zeigten sich tendenzielle Unterschiede zwischen den einzelnen Habitaten, die jedoch nicht mit denen der Kultivierungsergebnisse übereinstimmten. Allerdings ist der Umfang der zur Zeit vorliegenden Sequenzierungsergebnisse noch sehr begrenzt, so daß noch keine abschließenden Aussagen möglich sind (S. Weidner, persönliche Mitteilung).

Der Vergleich der aus der Amplifikation der RNA resultierenden TGGE-Muster mit denen aus der DNA in den verschiedenen Habitaten ergab, daß sich die Muster in einem Gradienten vom Boden zur Rhizoplane immer stärker ähnelten. Unter der Annahme, daß der Vergleich von RNA- und DNA-TGGE-Mustern Rückschlüsse auf die Expression der 16S rRNA-Gene der dominanten Bakterien ermöglicht (Felske *et al.*, 1996, Teske *et al.*, 1996b; Zoetendal *et al.*, 1998), ist zu vermuten, daß im Boden nur sehr wenige Bakterien mit einem hohen Ribosomensatz auch zahlenmäßig dominierten. Ähnliches fanden auch Felske *et al.* (1996) bei der Untersuchung einer Bodenprobe eines brachliegenden FAL-Bodens.

Aus dem Vergleich der Rhizoplanemuster läßt sich schließen, daß in dieser Fraktion diejenigen Sequenzen, die einen hohen Anteil an dem Gesamt-RNA-Extrakt ausmachten, auch zahlenmäßig

dominierten. Bei der Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaft der Luzernerhizoplane zeigte sich bei der Anwendung von V6-Sonden, daß sobald einzelne Sequenzen im RNA-Muster ein Hybridisierungssignal ergaben, ausschließlich Sequenzen mit einem identischen Migrationsverhalten im DNA-Muster ebenfalls immer ein Signal ergaben. Dieses bestätigte die Annahme, daß in diesem Habitat die selben Sequenzen im DNA- und RNA-Muster dominierten.

Die konfokalen-laser-scanning-mikroskopischen Analysen der in diesem Verbundprojekt durchgeführten Untersuchungen an der Luzerne (GSF Neuherberg) zeigten, daß mit zunehmender Assoziation der Bakterien an die Wurzeloberfläche der relative Anteil hybridisierbarer Bakterien zunahm, was übereinstimmend zu den TGGE-Analysen darauf hindeutet, daß zur Rhizoplane hin ein größerer Anteil der dominanten Bakterien einen höheren Ribosomengehalt aufwies. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß es mit zunehmender Nähe zur Wurzeloberfläche zu einer Erhöhung des Nährstoffangebotes durch die Wurzelexsudate kommt (Lynch, 1990), was zu einer höheren physiologischen Aktivität der Bakterien führen könnte (van Elsas *et al.*, 1998). Allerdings ist zu beachten, daß ein hoher Ribosomengehalt nicht immer auf eine hohe physiologische Aktivität zurückzuführen ist, da verschiedene Bakterien bei einer vergleichbar hohen Aktivität einen unterschiedlichen Ribosomengehalt aufweisen können (Flärdh *et al.*, 1992; Fegatella *et al.*, 1998). Duarte *et al.* (1998) vermuten, daß beide Phänomene eine Rolle spielen, deren Ausmaß bei den verschiedenen bakteriellen Gruppen unterschiedlich groß ist. Die Autoren konnten allerdings zeigen, daß Unterschiede in rRNA und rDNA generierten DGGE-Banden durchaus durch Unterschiede in der Aktivität der Bakterien bedingt sind. So zeigten fluoreszierende Pseudomonaden bedingt durch die Zugabe von Nährstoffen eine erhöhte Aktivität, die sich durch eine Intensitätszunahme der rRNA-Bande im Vergleich zu der DNA-DGGE-Bande äußerte.

Neben der Darstellung der bakteriellen Gemeinschaften in den verschiedenen Habitaten wurde in dieser Arbeit zudem das Ausmaß der Veränderungen bakterieller Gemeinschaften durch anthropogene (Inokulation mit *S. meliloti* L33) und natürliche Faktoren untersucht (Kap. 3.6.3; 3.6.4). Wie mehrfach beschrieben wurde, wird die Selektion einer spezifischen bakteriellen Gemeinschaft in der Rhizosphäre/Rhizoplane von einer Vielzahl von Umweltfaktoren beeinflusst (Übersicht bei Lynch, 1990), wobei hier drei Faktoren verglichen wurden, die einen maßgeblichen Einfluß haben:

- I) die Art der Pflanze, die durch Wurzelexsudation die wichtigste Energie- und Kohlenstoffquelle für heterotrophe Mikroorganismen in diesem Habitat darstellt;
- II) der Bodentyp, der je nach Charakteristikum und Herkunft ein unterschiedliches Reservoir von Mikroorganismen aufweist;
- III) die Pflanzenentwicklung, da sich in Abhängigkeit des Alters der Pflanze die Wurzelexsudation ändert.

Um Veränderungen der bakteriellen Populationen durch diese Faktoren zu vergleichen, wurden Clusteranalysen von TGGE-Mustern durchgeführt. Hierdurch war es möglich, das Ausmaß der Beeinflussung der Gemeinschaft durch eine Inokulation mit *S. meliloti* L 33 in Relation zu der natürlichen Variabilität darzustellen.

Der Vergleich der RNA-TGGE-Muster (Abb. 23, 30) ergab, daß in der Bodenfraktion der Bodentyp den größten Einfluß auf die bakterielle Gemeinschaft hatte. Übereinstimmend hierzu wurde von Griffiths *et al.* (1996) das Vorkommen unterschiedlicher bakterieller Populationen in Abhängigkeit

vom Bodentyp beschrieben.

In der Rhizosphäre war dagegen der Einfluß der Pflanze gegenüber dem Boden größer, noch stärker war der Einfluß der Pflanze in der Rhizoplanefraktion nachzuweisen. Sowohl an Roggenpflanzen als auch an den näher mit Luzerne verwandten Pflanzen Bohne und Klee wurde in diesen Habitaten jeweils eine offensichtlich andersartige bakterielle Gemeinschaft selektiert. Ähnliche Ergebnisse beschrieben Germida *et al.* (1998), die anhand von kultivierungsabhängigen Diversitätsuntersuchungen die bakteriellen Gemeinschaften der Rhizosphäre von Raps und Weizen in Böden verschiedener klimatischer Zonen untersuchten, wobei die Pflanzenart den größten Einfluß auf die Diversität hatte, gefolgt vom Bodentyp. Ebenso konnten Westover *et al.* (1997) deutliche Unterschiede in den kultivierbaren Rhizosphärenpopulationen verschiedener Pflanzengesellschaften nachweisen, die auf die unterschiedlichen Pflanzen zurückgeführt wurden. Im Gegensatz dazu zeigen andere Studien, daß durchaus der Bodentyp einen größeren Einfluß auf die bakterielle Rhizosphärenpopulation haben kann, wie z.B. auf die Pseudomonadenpopulation in der Rhizosphäre von Flachs und Tomate (Latour *et al.*, 1996). Desgleichen beschrieben Bachman & Kinzel (1992) den Boden als den entscheidenden Faktor bei der Untersuchung von sechs verschiedenen Pflanzen in vier unterschiedlichen Böden. Vermutlich sind diese unterschiedlichen Ergebnisse dadurch bedingt, daß verschiedene Pflanzen untersucht wurden, und zudem unterschiedliche Methoden zur Charakterisierung angewandt wurden. Zusätzlich erschwerend für den Vergleich der Ergebnisse ist, daß die Habitate Rhizosphäre und Rhizoplane in den verschiedenen Studien unterschiedlich definiert wurden, je nachdem, welche Methode zur Aufarbeitung gewählt wurde.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der Einfluß des Bodentyps in einem Gradienten vom Boden zur Rhizoplane abnahm, während der Einfluß der Pflanzen zunahm, wobei aber auch in den stärker mit den Wurzeln assoziierten Habitaten der Einfluß des Bodens noch aufzuzeigen war. Ebenso war in der Bodenfraktion der Einfluß der Pflanzen deutlich nachweisbar. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß feine Wurzelhaare bei der Entnahme des Bodens aus den Mikrokosmen nicht immer vollständig abgetrennt werden konnten, was eventuell den Einfluß des Faktors Pflanze in der Bodenfraktion fälschlicherweise verstärkt haben könnte.

Obwohl hier offensichtlich je nach Habitat die verschiedenen Faktoren unterschiedlich starke Auswirkungen auf die bakterielle Gemeinschaften haben, ist zu beachten, daß vielfältige Interaktionen zwischen Boden, Pflanze und mikrobieller Populationen bekannt sind, die eine Differenzierung zwischen den einzelnen Faktoren schwierig machen. So haben abiotische Faktoren, wie Temperatur, Feuchtigkeit und Bodenparameter, wie Bodenstruktur, pH-Wert oder Tonanteil, Einfluß auf bestimmte mikrobielle Populationen und das Pflanzenwachstum (Stacey, 1985; Turco & Bezdicek, 1987; Höper *et al.*, 1995; Mendes & Bottomley, 1998). Ebenso kann die Bodenstruktur an sich, die wiederum von dem Vorkommen und der Art der Pflanze beeinflusst wird, Auswirkungen auf die Wurzelexsudation haben (Boeuf-Tremblay *et al.*, 1995). Zudem kann die Verfügbarkeit von Wurzelexsudaten für Mikroorganismen je nach Pflanzenwachstum (Tate, 1995) und Bodentyp verändert sein. So können Aminosäuren und Peptide je nach Tongehalt in unterschiedlichem Ausmaß adsorbiert werden (Dashman & Stotzky, 1982; 1984), so daß deren Verfügbarkeit abnimmt (Gerard & Stotzky, 1973). Andererseits können aber auch Mikroorganismen die Quantität (Rovira & Ridge, 1973; Meharg & Killham, 1995) und Zusammensetzung der Wurzelexsudate (Mozafar *et al.*, 1992), ebenso wie das Pflanzenwachstum (Bever, 1994) beeinflussen.

Die zeitliche Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft im Verlauf des Pflanzenwachstums war relativ gering. Obwohl sich anhand der Clusteranalysen (Abb. 30) in der Rhizosphäre und Rhizoplane eine Veränderung in den Mustern nach 2 Wochen, nach 4 und 6 Wochen sowie nach 8 bzw. 10 Wochen aufzeigen ließ, war diese zeitliche Variabilität gegenüber den Veränderungen in der bakteriellen Gemeinschaft durch die Faktoren Boden und Pflanze deutlich geringer. In allen Habitaten zeigten die TGGE-Muster bei den unterschiedlichen Wachstumsphasen der Luzerne eine hohe Ähnlichkeit, was auf das Vorkommen von mehreren dominanten Gruppen hindeutet, die relativ stabil in der zeitlichen Entwicklung auftraten. Insgesamt war die zeitliche Sukzession noch am ehesten in den näher mit der Pflanzenwurzel assoziierten Bakteriengemeinschaften aufzuzeigen, im Gegensatz zum Boden. Ebenso beschrieben Mahaffe & Klöpper (1997) anhand von FAME-Analysen von Isolaten, daß sich im Verlauf der Wachstumsphase von Gurkenpflanzen die bakterielle Diversität im Boden kaum änderte, wogegen sie in der Rhizosphäre anzusteigen schien. Da sich die Quantität und Zusammensetzung von Wurzelexsudaten während der Pflanzenentwicklung ändern und auch in alten und jungen Teilen des Wurzelsystems unterschiedlich sein kann (Hale *et al.*, 1978; Vancura, 1988; Lynch & Whipps, 1990; Bowen & Rovira, 1991), kann dies zu der Anreicherung einer bestimmten Mikroflora je nach Entwicklungsstadium der Pflanze und Wurzelabschnitt führen (Liljeroth *et al.*, 1991). Dies hatte aber offensichtlich nur einen geringen Effekt auf die dominanten bakteriellen Sequenzen, die hier bei den TGGE-Analysen bei Verwendung universeller Primer erfaßt wurden. Allerdings bedeutet das nicht, daß der Rhizosphäreffekt minimal ist. Nicht-dominante Arten können durchaus während der Pflanzenentwicklung eine unterschiedliche Stimulanz erfahren (Sato & Jiang, 1996; Rooney-Varga *et al.*, 1997; Duineveld *et al.*, 1998), allerdings wurden bei der hier erfolgten Untersuchung offensichtlich nur wenige Arten so stark stimuliert, daß ihre veränderte Abundanz detektierbar war.

Die hier gezeigte relativ geringe zeitliche Variabilität stimmt überein mit Befunden von Duineveld *et al.* (1998) über die zeitliche Dynamik bakterieller Rhizosphärenpopulationen von Chrysanthemen anhand von DGGE-Analysen, sowie von Heuer (1998) bei der Untersuchung von Kartoffelrhizosphären mittels TGGE-Analysen. Auch in diesen Studien, in denen ebenfalls universelle 16S rDNA-Primer verwendet wurden, zeigten sich sehr stabile Muster während der Pflanzenentwicklung, wobei nur wenige und zum Teil nur schwache Banden eine zeitliche Variabilität aufwiesen. Insofern zeigten sich auch die dort erfaßten Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaft als relativ stabil, die Effekte der zeitlichen Sukzession waren gegenüber anderen Faktoren wie Boden- oder Standortfaktoren (Heuer, 1998) nur marginal.

Allerdings ist zu beachten, daß in allen diesen Studien die erste Probenahme nach der Aussaat frühestens nach zwei Wochen erfolgte. Da mehrfach beschrieben wurde, daß die größten Änderungen an der Wurzeloberfläche hauptsächlich in den ersten 10 Tagen nach Erscheinen der Wurzeln aus dem Samen auftreten (Fokkema & Schippers, 1986; Übersicht bei Vancura, 1988), ist es möglich, daß in dieser Zeit eine stärkere Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft und somit eine größere zeitliche Variabilität in Abhängigkeit der pflanzlichen Entwicklung nachzuweisen wäre.

Auswirkungen einer Inokulation mit *Sinorhizobium meliloti* L 33 waren am deutlichsten in der Rhizoplanefraktion aufzuzeigen, allerdings nur in den Wirtspflanzenhabitaten. In den Roggenhabitaten konnten keine Beeinflussungen nachgewiesen werden.

Hierbei zeigte sich sowohl im STM-Boden als auch im FAL-Boden der Luzernepflanzen der Effekt einer Inokulation durch Intensitätsänderungen mehrerer TGGE-Banden, im Gegensatz zu den Un-

tersuchungen in den kleinen Mikrokosmen, wo nur das Hinzukommen der *S. meliloti*-Banden in den inokulierten Ansätzen im FAL-Boden nachzuweisen war (Kap. 3.6.2). Dieses könnte bedingt sein durch die allgemein höhere Komplexität der Bandenmuster in den Versuchsansätzen, bei denen die größeren Mikrokosmen verwendet wurden (vgl. Abb. 16 und 21).

Das anhand des Vergleichs der TGGE-Muster ermittelte Ausmaß der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation war abhängig vom Bodentyp. So war der Effekt einer Inokulation im FAL-Boden – vor allem in der Rhizoplane – stärker ausgeprägt als im STM-Boden. Dies hing wahrscheinlich mit dem deutlich höheren endogenen *Sinorhizobium*-Titer im STM-Boden zusammen ( $10^3$ - $10^4$  KBE/gr Boden, Keller *et al.*, 1998), der durch die Anpflanzung von Luzerne im Jahr vor dem Einsatz in diesem Versuch bedingt war. Auf dem FAL-Boden wurden dagegen in den letzten fünf Jahren vor dem Versuchsbeginn keine Leguminosen angebaut, so daß hier der endogene *Sinorhizobium*-titer sehr gering war (kleiner als  $10^2$  KBE/gr Boden, Keller *et al.*, 1998). Trotzdem waren im FAL-Boden noch 48% der Luzernepflanzen noduliert (Tab. 5a), im STM-Boden allerdings mit 68% ein deutlich höherer Prozentsatz.

Untersuchungen der Zellzahl in der Rhizosphäre am Ende dieses Versuchsansatzes ergaben, daß die Zellzahl von *S. meliloti* L33 mit ca.  $10^6$  Z/gr Wurzel FG in beiden Böden in derselben Größenordnung lag (Miethling *et al.*, in Druck). Der höhere endogene *Sinorhizobium*-Titer im STM-Boden beeinträchtigte somit in dem hier untersuchten Zeitraum nicht das Überleben von *S. meliloti* L33, führte aber zu einer stark verringerten Infektion der Luzernewurzeln durch den inokulierten Stamm: Anhand der Nodulationsuntersuchungen zeigte sich, daß nach einer Inokulation mit *S. meliloti* in beiden Bodentypen nahezu alle Pflanzen noduliert waren. Dabei wurden 94% der Luzerneknöllchen im FAL-Boden durch den inokulierten Stamm induziert, im Gegensatz zu nur 21% im STM-Boden (Miethling *et al.*, in Druck), was auf eine geringe Durchsetzungsfähigkeit des inokulierten Stammes hinweist. Ebenso wurde mehrfach beschrieben, daß, bedingt durch die Konkurrenz endogener Rhizobien, inokulierte *Rhizobium*-Stämme nur eine geringe Nodulationsrate aufwiesen (Dale Noel & Brill, 1980; Hirsch & Spokes, 1988; 1994; Olivares *et al.*, 1993). Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß die Nischen, die durch die Inokulate besetzt werden könnten, schon durch gut adaptierte endogene Stämme belegt sind (Stacey, 1985). Ebenso könnten solche Konkurrenzphänomene dazu führen, daß in Böden mit einem hohen endogenen *Sinorhizobium*-Titer Beeinflussungen der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation nur in geringerem Umfang auftreten. Neben dem Vorkommen einer konkurrenzfähigen endogenen *Rhizobium*-Population kann aber auch der Bodentyp an sich Auswirkungen auf die Interaktionen zwischen endogenen und inokulierten Stämmen haben. So beschreibt Amager (1988), daß die Überlebensfähigkeit inokulierter Rhizobien und auch die Konkurrenzfähigkeit gegenüber endogenen Bakterien abhängig ist von dem jeweiligen Bodentyp.

Daß in den Roggenhabitaten keine Beeinflussung durch eine Inokulation aufzeigbar war, ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß in diesen Mikrokosmen bis zum Zeitpunkt der Probenahme der Rhizosphärentiter von *S. meliloti* L33 in beiden Bodentypen deutlich auf ca.  $10^4$  Z/gr Wurzel FG absank (Miethling *et al.*, in Druck).

Insgesamt war aber die Beeinflussung der dominanten Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation von *S. meliloti* L33 im Vergleich zu den anderen untersuchten Faktoren auch im FAL-Boden relativ gering. Dies zeigte sich anhand der durch die Clusteranalysen dargestellten Ähnlichkeiten der TGGE-Muster der Rhizoplane, die mit dem universellen Primerpaar

hergestellt wurden (Abb. 31). Im Vergleich zu der Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft im zeitlichen Verlauf der Wirtspflanzenentwicklung führte der Inokulationseffekt nur im FAL-Boden in ähnlichem Ausmaß zu einer Musterveränderung, wie die durch die zeitliche Sukzession bedingten, geringen Verschiebungen in der bakteriellen Gemeinschaft. Dagegen waren in allen Habitaten die durch die Pflanzenarten oder Bodentypen bedingten Musterveränderungen deutlich größer, wobei diese Ergebnisse durch andere Untersuchungsmethoden bestätigt werden konnten: Bei der Untersuchung des Ausmaßes der Beeinflussung durch eine Inokulation mit *S. meliloti* L 33 (Kap. 3.6.3) wurden die bakteriellen Rhizosphärenpopulationen der verschiedenen Versuchsvarianten von R. Miethling zusätzlich durch die Analyse der Fettsäure-Methylester-Muster (FAME) und Untersuchung des physiologischen Potentials der Gemeinschaften anhand ihres Verwertungs-Musters in BIOLOG-Mikrotiterplatten charakterisiert. Hierbei zeigte sich in Übereinstimmung zu den TGGE-Ergebnissen bei beiden Untersuchungsmethoden, daß die Pflanze den größten Einfluß auf die bakterielle Gemeinschaft hat, gefolgt vom Bodentyp. Ein Inokulationseffekt konnte anhand der BIOLOG-Untersuchungen allerdings nicht deutlich aufgezeigt werden, und auch die FAME-Analytik zeigte nur eine begrenzte Sensitivität. Nur in der bakteriellen Gemeinschaft der Luzerne im FAL-Boden konnte mit dieser Analyse ein Beimpfungseffekt aufgezeigt werden, der allerdings sehr gering war (Miethling *et al.*, in Druck).

Wie in den Versuchsansätzen bei der Verwendung kleiner Mikrokosmen war auch bei der Verwendung großer Mikrokosmen die Reproduzierbarkeit zwischen den aufeinanderfolgenden Jahren gering. Die TGGE-Muster der Luzerne des ein Jahr später durchgeführten Versuchsansatzes (Kap. 3.6.4) waren zwar untereinander sehr ähnlich, unterschieden sich aber deutlich von denen des vorherigen Jahres. Insofern etablierte sich jeweils eine offensichtlich andersartige bakterielle Gemeinschaft in den verschiedenen Versuchsansätzen, wobei die hierdurch aufgetretenen Musterveränderungen deutlich stärker waren, als die durch eine Inokulation hervorgerufenen Veränderungen (s. Abb. 31).

Daß der Vergleich der TGGE-Muster der Luzerne zwar innerhalb einer Probenahme eine hohe Reproduzierbarkeit ergab, zwischen den vier verschiedenen Probenahmen (Kap. 3.6) jedoch deutliche Musterunterschiede zeigte, ist sehr überraschend. Dies gilt um so mehr, da mehrfach die Selektion einer bestimmten bakteriellen Gemeinschaft an der Wurzel einer Pflanze beschrieben wurde (Neal *et al.*, 1970, 1973; Lynch, 1990; Germida *et al.*, 1998) und zudem die Luzernepflanzen in demselben Bodentyp und zumindest in jeweils zwei Versuchsansätzen unter ähnlichen Wachstumsbedingungen angezogen wurden. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese hohe Variabilität zwischen den verschiedenen Gewächshausversuchen wäre die Hypothese, daß die Rhizosphäre bzw. Rhizoplane zwar ein stark selektives Habitat ist, daß aber die bakteriellen Gemeinschaften in diesen Habitaten eine sehr hohe Diversität aufweisen. Dies könnte dazu führen, daß die entsprechenden Nischen von mehreren unterschiedlichen Mitgliedern der bakteriellen Gemeinschaft prinzipiell besiedelt werden können. Welche Bakterien sich letztendlich durchsetzen können, könnte z.B. von unterschiedlichen Randbedingungen bei der Wurzelbildung abhängen. So wurden die Versuchsansätze jeweils in anderen Gewächshäusern durchgeführt. Außerdem wurde in den beiden Versuchsansätzen, in denen eine Inokulation mit *S. meliloti* erfolgte (Kap. 3.6.2 und 3.6.3), der Boden vor der Aussaat längere Zeit gelagert. Selbitschka *et al.* (1995) vermuten, daß eine längere Lagerung des Bodens zu veränderten Bodeneigenschaften führt, die die Überlebensfähigkeit von *S. meliloti* Stämmen reduzieren kann. Hierdurch könnte z.B. auch die nur in dem ersten Versuchs-



ansatz bei Verwendung kleiner Mikrokosmen dominierende *Pseudomonas putida*-Population beeinflusst worden sein (Kap. 3.6.1-3.6.2), zumal bekannt ist, daß besonders Bodenfaktoren eine sehr große Auswirkung auf die Zusammensetzung fluoreszierender Pseudomonadenpopulationen haben (Latour *et al.*, 1996). Ebenso können Unterschiede in der Bewässerung der Pflanzen in den verschiedenen Gewächshäusern Auswirkungen auf die bakterielle Gemeinschaft haben. Iwasaki *et al.* (1994) konnten zeigen, daß der Wassergehalt verschiedener Böden die Population von *P. putida* maßgeblich beeinflussen kann. Zudem konnte der Boden nicht exakt von derselben Stelle des Versuchsfeldes entnommen werden, was ebenfalls Auswirkungen auf die bakterielle Flora haben könnte. Allerdings konnten Schwieger & Tebbe (1998) nur geringfügige Veränderungen in SSCP-Mustern von Luzernerhizosphären nachweisen, wenn die Pflanzen von verschiedenen Stellen desselben Versuchsfeldes untersucht wurden.

Aufgrund der hohen Variabilität der Luzernemuster der verschiedenen Versuchsansätze haben Untersuchungen darüber, welche TGGE-Sequenzen durch eine Inokulation beeinflusst werden, eventuell nur eine begrenzte Aussagekraft, da sie nicht unbedingt auf weitere Untersuchungen übertragbar sind. Da zudem häufig Labor- oder Gewächshausergebnisse nicht auf Freilandversuche übertragbar sind (Tiedje *et al.*, 1989; Hirsch & Spokes, 1994) bleibt die Frage offen, ob im Freiland die bakterielle Gemeinschaft der Luzerne in aufeinanderfolgenden Jahren eine größere Stabilität aufweist und ob auch hier eine Inokulation von *S. meliloti* L 33 zu einer Beeinflussung der Gemeinschaft führt. Deren detaillierte Untersuchung hätte dann sicherlich eine größere Relevanz.

Die Analyse der Rhizoplane fraktionen von Roggen und Luzerne mit dem spezifischen Primer R1463 ergab erwartungsgemäß, daß auch auf diese Populationen die Art der Pflanze einen sehr großen Einfluß hatte, gefolgt vom Bodentyp (Abb. 27). Wie bei Verwendung der universellen Primer konnten auch mit dem Primerpaar F984-GC/R1463 keine Veränderungen in den TGGE-Mustern der Roggenrhizoplane durch eine Inokulation mit L33 aufgezeigt werden. Allerdings ergab sich durch eine Inokulation eine deutliche Beeinflussung der mit diesem Primerpaar erfaßten Mikroorganismen aus der Luzernerhizoplane im FAL-Bodentyp, jedoch nicht im STM-Bodentyp. Daß im STM-Bodentyp kein Inokulationseffekt anhand des Vergleichs der TGGE-Muster aufgezeigt werden konnte, liegt vermutlich an den oben beschriebenen Konkurrenzphänomenen zwischen den inokulierten und endogenen Sinorhizobien in diesem Bodentyp.

In den nicht-inokulierten Ansätzen der Luzerne im STM-Boden trat je eine Bande auf (AF4\*b, Abb. 26), die ein identisches Laufverhalten und eine hohe Sequenzähnlichkeit (99,8%) zu *S. meliloti* zeigte. Unter der Berücksichtigung, daß die Sequenzzuordnung auf der Einzelstrang-Analyse einer Partialsequenz beruhte, kann aufgrund dieser nur geringfügigen Sequenzabweichung zu *S. meliloti* vermutet werden, daß diese Bande wahrscheinlich aus der im STM-Boden in erhöhter Anzahl vorkommenden endogenen *S. meliloti*-Population resultierte. Allerdings konnte keine Differenzierung zwischen endogenen und inokulierten *S. meliloti*-Stämmen gemacht werden, da in der hier vorliegenden Untersuchung nur die Analyse der 16S rRNA erfolgte. Insofern führte eine Inokulation in diesem Bodentyp nicht zu dem Auftreten einer zusätzlichen, anhand des Laufverhaltens oder der Sequenz unterscheidbaren Bande; im Gegensatz zum FAL-Bodentyp, wo in den beimpften Ansätzen die von dem inokulierten Stamm resultierende Bande aufzuzeigen war. Allerdings wurde nur eine Klonsequenz der eluierten Bande 4b aus dem STM-Boden sequenziert, so daß nicht auszuschließen ist, daß noch weitere Sequenzen zu der Ausprägung dieser Bande beigetragen haben (s. auch Kap. 4.2.1).

Aufgrund der Beeinflussung mehrerer Banden des aus der Verwendung des spezifischen Primers resultierenden reduzierten Bandenmusters der Luzerne im FAL-Boden konnte der Inokulationseffekt – im Gegensatz zu der Untersuchung mittels universeller Primer – deutlich aufgezeigt werden (Abb. 27). Obwohl der Inokulationseffekt im Vergleich zum Pflanzenfaktor wesentlich geringer war, konnte er im Vergleich zu der Beeinflussung durch den Bodentyp in der Rhizoplane sehr deutlich nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß – im Vergleich zu der Beeinflussung durch natürliche Faktoren – die mit dem spezifischen Primer erfaßten Sequenzen im FAL-Boden durch eine Inokulation stärker beeinflußt wurden als die dominanten Sequenzen der bakteriellen Gemeinschaft.

Die Charakterisierung des aus der Amplifikation mit dem spezifischen Primer resultierenden Bandenmusters der Luzerne ergab, daß im FAL-Boden zwei Sequenzen mit Verwandtschaft zu *Rhizobium leguminosarum* bzw. *S. meliloti* durch eine Inokulation verdrängt wurden (AF5 und AF6, Abb. 26). Ebenso konnten auch bei der Verwendung kleiner Mikrokosmen Inokulationseffekte auf Sinorhizobien-verwandte Sequenzen nachgewiesen werden, die bei der Untersuchung anhand von universellen Primern nicht aufgezeigt werden konnten (Kap. 3.6.2). Zwei Sequenzen mit hoher Verwandtschaft zu *S. meliloti* (AG1 und AG2, Abb. 17) waren in dem nicht-inokulierten Kontrollansatz nicht nachzuweisen. Da sie jedoch auch nur eine geringe Intensität in den inokulierten Ansätzen aufwiesen, ist die Relevanz dieser Unterschiede wahrscheinlich gering. Deutlicher allerdings war die Verdrängung einer Sequenz mit Verwandtschaft zu *R. leguminosarum* (AG3) nachzuweisen. Ein Vergleich der Partialsequenzen von AG3 und AF5 ergab eine Homologie von 100%. Dieser Befund, daß bei den beiden unabhängigen Versuchsansätzen, in denen die Pflanzen unter verschiedenen Bedingungen und zu unterschiedlichen Zeiten beprobt wurden, dieselben Partialsequenzen durch eine Inokulation verdrängt wurden, weist auf einen eher generellen Effekt hin.

Diese Untersuchungen zeigen, daß durch Verwendung von spezifischen Primern, die das „Beobachtungsfenster“ auf die Darstellung bestimmter Gruppen verschiebt, Effekte auch in Gruppen mit geringerer Dominanz, aber deswegen nicht unbedingt mit geringerer ökologischer Relevanz, nachgewiesen werden können. Die geringe Abundanz dieser Sequenzen läßt sich daraus ableiten, daß diesen Sequenzen nach Eluierung und Amplifikation mit universellen Primern keine dominanten Banden in den entsprechenden TGGE-Mustern zugeordnet werden konnten, die aus der Verwendung der universellen Primern resultierten (ohne Abbildung). Ebenso konnten Robledo *et al.* (1998) durch Verwendung von spezifischen Primern, die gezielt Trifolitoxin-sensitive  $\alpha$ -Proteobakterien erfassen, Auswirkungen einer Inokulation von Trifolitoxin-produzierenden Rhizobien auf die bakterielle Population anhand von RISA-Analysen aufzeigen, die bei Verwendung von universellen Primern nicht detektierbar waren.

Zusammenfassend ergibt sich aus der vorliegenden Untersuchung folgende Aussage, wenn die relative Größe des Effektes auf die bakterielle Gemeinschaft als bedeutender Parameter der Bewertung von menschlichen Eingriffen angesehen wird: Die dominanten Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaft des Bodens oder in Pflanzenassoziation wurden durch die Inokulation mit einem – abgesehen von der gentechnischen Markierung – unveränderten Mitglied der Gemeinschaft in Relation zu ihrer natürlichen Variabilität nur unwesentlich beeinflußt. Bei nahe verwandten Sequenzen des Inokulums, die allerdings nur eine geringe Abundanz aufwiesen, konnte jedoch eine stärkere Beeinflussung aufgezeigt werden.

Allerdings erfolgten diese Untersuchungen nur nach 6 bzw. 10 Wochen Wachstum der Wirtspflanzen, länger andauernde Beeinflussungen wurden nicht untersucht. Insofern ist nicht auszuschließen, daß hier nur ein vorübergehender Effekt aufgezeigt wurde und nach längeren Zeiträumen keine Veränderungen mehr nachgewiesen werden können, wie auch bei Villadeas *et al.* (1996) beschrieben. Die Autoren untersuchten die Auswirkungen der Freisetzung eines hochkompetitiven *S. meliloti*-Stammes auf die gut nodulierenden Stämme der endogenen *Sinorhizobium meliloti* Population anhand von ERIC-PCR und IS-Analysen, wobei zwei Jahre nach der Freisetzung keine Veränderungen mehr nachgewiesen werden konnten.

Andere Studien, bei denen die Auswirkung einer Freisetzung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen untersucht wurden, ergaben unterschiedliche Auswirkungen auf die mikrobiellen Populationen. So konnten bei der Inokulation von Stämmen, die ebenfalls nur Markergene enthielten, wie von *Erwinia carotovora* ssp. (Orvos *et al.*, 1990) oder *P. fluorescens* (Kozdrój, 1995) keine Effekte auf die kultivierbaren bakteriellen Populationen des Bodens nachgewiesen werden. Ebenso konnten keine Auswirkungen auf die Rhizosphärenpopulationen von Zuckerrüben durch eine Inokulation von *Pseudomonas* sp. anhand von BIOLOG-Analysen (Ellis *et al.*, 1995) und von Gurken durch eine Freisetzung von *P. fluorescens* anhand von FAME-Analysen von Isolaten (Mahaffe & Klöpfer, 1997b) aufgezeigt werden.

Nur vorübergehende Veränderungen wurden beschrieben bei der Inokulation eines Antibiotika-produzierenden *P. fluorescens*-Stammes in Mikrokosmen mit Gurken (Natsch *et al.*, 1997) und eines modifizierten Actinomycetenstammes in Böden (Crawford *et al.*, 1993), was jeweils zu einer verringerten Abundanz der endogenen bakteriellen Population führte; sowie bei einer Inokulation mit *Corynebacterium glutamicum*, was zu einer vorübergehenden Abnahme an verwendeten C-Quellen bei BIOLOG-Analysen des Bodens führte (Vahjen *et al.*, 1995). Ebenfalls konnte nur eine vorübergehende Verringerung der relativen Häufigkeit von schnellwachsenden Bakterien in der Rhizosphäre junger Weizenpflanzen nach einer Inokulation mit Markergen-tragenden *Pseudomonas aureofaciens*- (De Leij *et al.*, 1994) und *P. fluorescens*-Zellen (De Leij *et al.*, 1995) nachgewiesen werden. In der letztgenannten Studie fanden die Autoren in Übereinstimmung zu der in dieser Arbeit erfolgten Untersuchung an Luzerne ebenfalls eine stärkere Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft an näher an der Wurzeloberfläche assoziierten Habitaten im Vergleich zum Boden.

Die Freisetzung von gentechnisch veränderten Pseudomonaden in Böden, die sich durch verbesserte Abbauleistungen von Schadstoffen auszeichneten, führte ebenfalls nur zu kurzfristigen Effekten, die sich in einer Erhöhung (Bej *et al.*, 1991) oder Verringerung (Doyle *et al.*, 1991) der bakteriellen Diversität äußerten. In der letztgenannten Studie führten die von dem GVO gebildeten Intermediärprodukte bei dem Abbau eines Schadstoffes jedoch zu einer signifikanten und langandauernden Hemmung von Pilzen.

Zusammenfassend traten also mit Ausnahme der letztgenannten Studie Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft, falls sie überhaupt nachweisbar waren, nur kurzfristig innerhalb einer Vegetationsperiode auf. Zudem konnte mehrfach aufgezeigt werden, daß die Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft in Abhängigkeit von der Wirtspflanzenentwicklung oder von Standortfaktoren deutlich größer war als die nachgewiesenen Inokulationseffekte (Ellis *et al.*, 1995; Mahaffe & Klöpfer, 1997b; Natsch *et al.*, 1997).

Übereinstimmend zu diesen hier erfolgten Untersuchungen über die Auswirkung einer Inokulation auf nahe verwandte Sequenzen von *S. meliloti* deuten allerdings auch Untersuchungen wie die von Natsch *et al.* (1997) und De Leij *et al.* (1995), bei denen die vorhandene Pseudomonadenpopulation durch eingeführte Pseudomonaden reduziert wurde, darauf hin, daß am ehesten eine Verdrängung von den Bakterien stattfindet, die ähnliche Nischen wie die eingeführten Bakterien besetzen. Ebenso führte eine Inokulation eines rifambicin-resistenten *Pseudomonas*-Stammes zwar nicht zu einer Beeinflussung der kultivierbaren heterotrophen Bakterien, wohl aber zu einer signifikanten Verdrängung von fluoreszierenden Pseudomonaden in der Rhizoplane von Weizen (Bolton *et al.*, 1991). Bei diesen genannten Studien wurden – wie auch in dieser Arbeit – Bakterien inokuliert, die sich nur durch die Insertion von Markergenen von den entsprechenden Wildtyp-Stämmen unterschieden. Stärkere Beeinflussungen der bakteriellen Gemeinschaft sind jedoch zu erwarten, wenn Stämme mit veränderten physiologischen Eigenschaften, wie z.B. verbesserter Durchsetzungsfähigkeit oder Nodulationseffizienz freigesetzt werden (Heidenreich, 1999).

Um solche Auswirkungen auf die mikrobielle Gemeinschaft darzustellen, erscheinen Untersuchungsmethoden, die wie T-DGGE oder SSCP einen „genetischen Fingerabdruck“ der mikrobiellen Gemeinschaft erstellen, im Vergleich zu Methoden, die heute routinemäßig bei der ökotoxikologischen Bewertung eingesetzt werden, mindestens ebenso gut geeignet. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, sind nicht nur Beeinflussungen dominanter Bakteriengruppen aufzeigbar, sondern durch Anwendung spezifischer Primer können auch gezielt Auswirkungen auf bestimmte, weniger abundante Gruppen untersucht werden. Hierbei zeigte im Vergleich zu der Analyse von 16S rDNA-Fragmenten die Untersuchung von 16S rRNA-Zielsequenzen eine größere Empfindlichkeit bei der Darstellung von Veränderungen in der bakteriellen Gemeinschaft. Wie in Kap. 3.6.3 dargestellt ergaben Clusteranalysen von TGGE-Mustern, die aus der Analyse der 16S rDNA im Vergleich zur 16S rRNA durchgeführt wurden (Abb. 24), daß die durch die Faktoren Pflanze, Bodentyp und Inokulation hervorgerufen Musterverschiebungen in den DNA-Mustern zwar in denselben Relationen auftraten, allerdings deutlich geringer ausgeprägt waren.

Wie ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kann die Ähnlichkeit einer Vielzahl von TGGE-Mustern anhand von Clusteranalysen dargestellt werden, was Rückschlüsse auf das Ausmaß der Veränderung bakterieller Gemeinschaften durch verschiedene Faktoren zuläßt. Hierdurch ist es möglich, die Größe der Beeinflussung durch einen Faktor, z.B. einer anthropogen bedingten Störung, in Relation zu anderen, natürlich vorkommenden Effekten zu setzen und somit ansatzweise zu bewerten. Wie in Kap. 4.2.1 erläutert, ist hierbei allerdings zu berücksichtigen, daß die mit dieser Methode dargestellte Diversität sehr eingeschränkt sein kann und somit nur relative Änderungen in der bakteriellen Gemeinschaft erfaßt werden können. Trotzdem konnte in jüngster Zeit gezeigt werden, daß Clusteranalysen von T-DGGE-Mustern sehr gut geeignet sind, um Veränderungen in bakteriellen Gemeinschaften bei der Untersuchung einer großen Probenmenge darzustellen. So untersuchten Duineveld *et al.* (1998) die saisonale Diversität von Rhizosphärenpopulationen, wobei in dieser Studie die Intensität der Banden allerdings nicht berücksichtigt wurde. Eichner *et al.* (1999) ermittelten Auswirkungen von sehr gravierenden Eingriffen, wie einer Phenolzugabe, auf die bakterielle Gemeinschaft anhand von Clusteranalysen, die deutlich nachzuweisen waren. In der hier durchgeführten Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaft der Luzerne konnte aufgezeigt werden, daß auch weniger gravierende Verschiebungen detektierbar sind, wie der Effekt einer Inokulation von *S. meliloti* in einem Boden mit einem hohen endogenen *Sinorhizobium*-Titer.

Bei den derzeitigen, routinemäßig eingesetzten Testverfahren, z.B. bei der Zulassung von Herbiziden, werden Variationen genereller Umsatzgrößen der mikrobiellen Gemeinschaft wie CO<sub>2</sub>-Produktion und Stickstoffmineralisierung erfaßt, oder stellvertretend die Auswirkung eines Effektes auf einzelne Bakterien untersucht. Die Erfassung dieser Summenparameter kann zwar Aussagen zu einer Gesamtbeeinflussung der analysierten Gemeinschaft zulassen, aber keine Fluktuationen innerhalb der Gemeinschaft aufdecken, so daß die hierbei ermittelten Veränderungen einer Gemeinschaft nicht sehr sensitiv und zudem schwer zu extrapolieren sind (Backhaus *et al.*, 1999). Um allerdings die oben genannten molekularbiologischen Untersuchungsmethoden als gängige Testverfahren einsetzen zu können, muß die Standardisierbarkeit dieser Methoden erhöht werden. Zudem muß die Vergleichbarkeit der mit diesen Methoden erhaltenen Ergebnisse mit denen gängiger Testverfahren aufgezeigt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei Verwendung universeller Primer das mit der TGGE erhaltene Bandenmuster in ähnlicher Weise die Diversität dominanter Sequenzen repräsentiert, wie sie auch mit anderen molekularbiologischen und mikrobiologischen Methoden (Analyse von Isolaten und Klonbibliotheken, *in situ*-Hybridisierungen) dargestellt werden kann. Zudem führte die Auswertung der Muster anhand von Ähnlichkeitsdendrogrammen zu vergleichbaren Ergebnissen wie andere Methoden zur Differenzierung bakterieller Gemeinschaften (FAME und BIOLOG). Ebenso konnten Engelen *et al.* (1998) schon beispielhaft die gute Korrelation der mit der TGGE ermittelten Auswirkung von Herbizidapplikationen auf Bodengemeinschaften zu konventionellen Testverfahren aufzeigen, wobei allerdings Dosis-Wirkungsbeziehungen noch nicht untersucht worden sind. Da sowohl Aussagen über die Größe einer akuten Beeinflussung, als auch über deren zeitlichen Verlauf möglich sind, stellen diese Methoden eine sinnvolle Ergänzung zu anderen konventionellen und molekularbiologischen Techniken dar. Zudem bietet die T-/DGGE-Analyse den Vorteil, daß nähere Charakterisierungen derjenigen Sequenzen, die eine Beeinflussung erfahren, möglich sind.

Nach wie vor bleibt aber auch bei der Anwendung dieser Methoden die Beurteilung der dargestellten Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaft durch verschiedene Faktoren – z.B. einer Inokulation – problematisch, da grundsätzlich keine Aussage darüber möglich ist, inwieweit „wichtige“ oder charakteristische Veränderungen der genetischen Struktur aufgedeckt wurden. Anhand der mehr als 100jährigen Erfahrungen über Auswirkungen von Inokulationen, bei denen bisher keinerlei negativen Auswirkungen auf die menschliche und pflanzliche Gesundheit oder Bodenfruchtbarkeit nachgewiesen werden konnten (Amager *et al.*, 1988; Beringer & Bale, 1988), läßt sich vermuten, daß auch die in dieser Arbeit aufgezeigten Veränderungen in der bakteriellen Gemeinschaft keine negativen Auswirkungen haben. Dies gilt um so mehr, da nach den Kriterien von De Leij *et al.* (1995) die Inokulation des gentechnisch veränderten Stammes die selben Beeinflussungen hervorrief wie der nicht veränderte Wildtypstamm (Kap. 3.6.2) und keinerlei Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum (Kap. 3.6.4) nachzuweisen waren. Allerdings sind auch Auswirkungen einer bakteriellen Inokulation auf andere Mitglieder der mikrobiellen Population mit anderen ökologischen Nischen, z.B. Pilzen oder auf Mitglieder anderer Trophieebenen beobachtet worden (Doyle *et al.*, 1991; 1995), die hier nicht untersucht wurden.

Ein inokulierter Stamm muß gegen die endogene Bakterienpopulation konkurrenzfähig sein, um zu überleben. Dies bedeutet gleichzeitig, daß der inokulierte Stamm – zumindest vorübergehend – eine in der Regel schon besetzte ökologische Nische okkupieren, und so die entsprechenden endogenen Bakterien verdrängen muß (Orvos *et al.*, 1990). Insofern ist wahrscheinlich bei einer Inoku-

lation eine begrenzte Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft immer zu erwarten. Dabei kann aber gerade die Verdrängung von endogenen Bakterien ein sehr schwerwiegender Eingriff in das Ökosystem sein (van Elsas *et al.*, 1998), so daß darauf geachtet werden sollte, daß diese Veränderungen, z.B. durch die Entwicklung von Sicherheitsstämmen, nur vorübergehend sind (Herrera-Cervera *et al.*, 1997). Tiedje *et al.* (1989) vermuten zwar, daß natürliche bakterielle Gemeinschaften eine sehr hohe funktionelle Redundanz aufweisen, so daß der Austausch einer Spezies durch natürliche oder gentechnisch veränderte Mikroorganismen nur geringe Auswirkungen hat. Allerdings ist anzunehmen, daß in intensiv genutzten Ökosystemen, wie in der Landwirtschaft, die Diversität abnimmt und so eine Inokulation größere Auswirkungen haben könnte (Fredrickson & Hagedorn, 1992; Kozdrój, 1995).

Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob die anhand von Begleitforschungen detektierbaren Auswirkungen auf die mikrobielle Gemeinschaft auch ökologisch relevant sind (Doyle *et al.*, 1995) und bis zu welchem Ausmaß Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft tolerierbar sind, so daß anhaltende oder aus menschlicher Sicht negative Effekte auf das Ökosystem vermieden werden können. Aufgrund des geringen Verständnisses über das Ökosystem Boden und der vielfältigen Interaktionen der Bodenorganismen untereinander sind diese Fragen derzeit nur schwer zu beantworten, zumal trotz erheblicher Fortschritte in der Entwicklung von Methoden zur Untersuchung der Diversität wahrscheinlich nur ein Teil der Beeinflussungen detektiert wurde und derzeit prinzipiell detektierbar ist (Doyle *et al.*, 1995). Insofern kann eine Bewertung der aufgezeigten Effekte nur sehr eingeschränkt erfolgen, so daß auch weiterhin ein verbessertes Verständnis über die Struktur und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaften dringend erforderlich ist.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaft der Luzerne durch natürliche und induzierte Faktoren in Gewächshausversuchen untersucht. Anlaß hierfür war die Frage nach dem Ausmaß der Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation mit dem *Sinorhizobium meliloti*-Wildtypstamm 2011 und dem gentechnisch veränderten Stamm L33, der sich nur durch eine *luc*-Markierung von dem Wildtypstamm unterscheidet.

Die Analysen erfolgten anhand der Auftrennung amplifizierter DNA- und RNA-Fragmente der Habitate Boden, Rhizosphäre und Rhizoplane durch die TGGE. Hierzu wurde ein Protokoll modifiziert, das sowohl die parallele Extraktion als auch die Amplifikation von 16S rDNA- und rRNA-Sequenzen aus verschiedenen Bodentypen ermöglichte, um durch den Vergleich der daraus resultierenden TGGE-Bandenmuster Rückschlüsse auf Veränderungen in der zahlenmäßigen Dominanz und Aktivität einzelner Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaft zu ziehen.

Die Untersuchung der bakteriellen Populationen der Luzerne, schwerpunktmäßig der Rhizoplane, erfolgte in Rahmen eines Verbundprojektes in einem polyphasischen Ansatz. Dadurch war es möglich, die bakteriellen Gemeinschaften umfassend zu beschreiben und die Ergebnisse der verschiedenen Methoden mit denen der TGGE zu vergleichen. Hierzu wurden Methoden zur Bandenelution aus TGGE-Mustern und zur Southern-Blot-Hybridisierung weiterentwickelt und etabliert, die sowohl die Charakterisierung des Bandenmusters ermöglichten, als auch die Zuordnung von Isolaten oder Klonen zu einzelnen TGGE-Banden anhand von V6-Sonden erlaubten.

Insgesamt stimmten die mit den verschiedenen Methoden erhaltenen Ergebnisse gut überein, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die mit der TGGE erzeugten Muster bei Verwendung universeller Primer – trotz vielfältiger Limitierungen – die Diversität der dominanten Sequenzen einer bakteriellen Gemeinschaft reflektieren können. Die im ersten Untersuchungsjahr detektierte Dominanz von *P. putida* und der *Rubrivivax gelatinosus*-Gruppe in der Luzernerhizoplane konnte im nachfolgenden Jahr nicht mehr aufgezeigt werden. In Übereinstimmung zu den Ergebnissen der Projektpartner führte die hier erfolgte Inokulation mit *S. meliloti* WT 2011 und L33 bei TGGE-Untersuchungen anhand von universellen Primern zu einer sehr starken Dominanz der inokulierten Stämme in der Rhizoplane fraktion. Daneben konnten keine weiteren Veränderungen aufgezeigt werden. Die durch die Inokulation mit dem Stamm L 33 und dem Wildtypstamm 2011 bedingten Beeinflussungen in der bakteriellen Gemeinschaft waren identisch, so daß durch die gentechnische Veränderung an sich kein Effekt aufgezeigt werden konnte.

Bei dem TGGE-Mustervergleich der Habitate Boden, Rhizosphäre und Rhizoplane zeigte sich eine deutliche Veränderung der bakteriellen Gemeinschaften vom Boden zur Rhizoplane bei allen in dieser Arbeit untersuchten Pflanzenarten. Der Vergleich der aus der Amplifikation der RNA resultierenden TGGE-Muster mit denen aus der DNA in den verschiedenen Habitaten ergab zudem, daß sich die Muster in einem Gradienten vom Boden zur Rhizoplane immer stärker ähnelten. Dies deutet darauf hin, daß im Gegensatz zur Rhizoplane im Boden nur sehr wenige Bakterien mit einem hohen Ribosomengehalt auch zahlenmäßig dominierten.

Um das Ausmaß von Veränderungen in den bakteriellen Gemeinschaften darzustellen, wurden in dieser Arbeit TGGE-Muster verglichen. Hierzu wurde eine Methode zur Bildauswertung von TGGE-Mustern etabliert, die es ermöglichte, eine Vielzahl von Proben zu vergleichen. Die relative Ähnlichkeit der Bandenmuster wurde unter Berücksichtigung der Anzahl, des Laufverhaltens und

der Intensität der Banden in Form einer Clusteranalyse dargestellt. Die bei der Interpretation der Dendrogramme auftretenden Limitierungen wurden ausführlich diskutiert. Das Potential dieser Clusteranalysen konnte in einer anderen Zusammenarbeit bestätigt werden, bei der weitere „Community-level“ Untersuchungen (FAME und BIOLOG) hierzu qualitativ gute Übereinstimmungen zeigten. Bei diesen Untersuchungen wurde der Einfluß einer Inokulation von *S. meliloti* L33 auf die bakteriellen Gemeinschaften von Luzerne und Roggen in größeren Mikrokosmen untersucht, wobei nur in den Wirtspflanzenhabitaten eine Beeinflussung der bakteriellen Gemeinschaft nachzuweisen war. Um das Ausmaß der Beeinflussung darstellen zu können, wurden vergleichend hierzu die Veränderungen in den bakteriellen Gemeinschaften durch natürliche Faktoren, wie die zeitliche Sukzession in Abhängigkeit von der Wirtspflanzenentwicklung und Beeinflussungen durch Bodentyp und Pflanzenart untersucht. Es zeigte sich, daß die Auswirkungen der verschiedenen Faktoren zu stärkeren Veränderungen in den daraus resultierenden RNA-Mustern als in den DNA-Mustern führten. Insofern wies der Vergleich der RNA-Muster gegenüber den DNA-Mustern eine größere Sensitivität auf.

Der Vergleich der RNA-Muster ergab, daß in einem Gradienten vom Boden zur Rhizoplane der Einfluß der Pflanze zunahm, während der Einfluß des Bodens immer geringer wurde. Gegenüber diesen Faktoren war die Veränderung in der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation mit dem Stamm L33 in den Luzernehabitaten nur sehr gering ausgeprägt, wobei das Ausmaß der Beeinflussung vom Bodentyp abhängig war. In dem Boden mit einem erhöhten endogenen *Sinorhizobium*-Titer waren, wahrscheinlich aufgrund von Konkurrenzphänomenen, Auswirkungen der Inokulation mit L 33 auf die bakterielle Gemeinschaft geringer ausgeprägt. Die zeitliche Variabilität der bakteriellen Gemeinschaft in Abhängigkeit von der Wirtspflanzenentwicklung war relativ gering. Die Bandenmuster zeigten eine hohe Ähnlichkeit, wobei die Veränderungen ungefähr in der gleichen Größenordnung lagen, wie die durch eine Inokulation mit L33 bedingten Veränderungen im Bandenmuster.

Um zu ermitteln, ob eine Inokulation nahe verwandte Sequenzen beeinflusste, wurde ein Primer für TGGE-Anwendungen entwickelt, der selektiv *Sinorhizobium meliloti*-verwandte Sequenzen, hauptsächlich aus der *Rhizobium-Agrobacterium* Gruppe der  $\alpha$ -Proteobakterien, erfaßt. Hierdurch war es möglich, diese Sequenzen auch dann noch selektiv zu amplifizieren, wenn sie in der bakteriellen Gemeinschaft nicht dominierten. Bei der Untersuchung der Rhizoplanefraktion zeigte sich, daß in dem Bodentyp, in dem nur eine geringe endogene *Sinorhizobium*-Population vorhanden war, die mit diesem Primer erfaßten Sequenzen im Vergleich zu der Beeinflussung durch natürliche Faktoren sehr viel stärker durch eine Inokulation beeinflusst wurden als die dominanten Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaft. Obwohl bei den unterschiedlichen Versuchsansätzen - die in verschiedenen Gewächshäusern erfolgten - die Musterreproduktion bei Verwendung universeller Primer nur sehr gering war, konnte anhand des spezifischen Primers gezeigt werden, daß in den unterschiedlichen Ansätzen jeweils eine zu *R. leguminosarum* verwandte Sequenz durch die Inokulation mit *S. meliloti* verdrängt wurde. Dies weist auf einen eher generellen Effekt hin.

Aufgrund des geringen Verständnisses über die Struktur und Funktion der Mikroorganismen in diesen Habitaten ist allerdings derzeit nur schwer zu bewerten, ob die hier aufgezeigten Beeinflussungen der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Inokulation, vor allem bei nahe verwandten Sequenzen, auch ökologisch relevant sind.



## 6. Literatur

**Akkermans D.L., J.D. van Elsas und F.J. de Bruijn.** 1995. Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands

**Amager, N.** 1988. Introduction of *Rhizobium* into soils. *In:* W. Klingmüller (ed.). Risk Assessment for deliberate release. Springer-Verlag, 29-35

**Amager, N. und D. Delgutte.** 1990. Monitoring genetically manipulated *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* released in the field. *In:* D.R. MacKenzie, S.C. Henry (eds.). Proceedings of the Kiawah Island Conference on biological monitoring of genetically engineered plants and microbes. Agricultural Research Institute, Bethesda, Md. 221-225

**Amann, R.I., W. Ludwig und K.H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169

**Atlas, R.M.** 1984. Use of microbial diversity measurement to assess environmental stress. *In:* M.J. Klug, C.A. Reddy (eds.). Current Perspectives in Microbial Ecology. American Society for Microbiology. Washington DC. 540-545

**Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidmann, J.A. Smith und K. Struhl.** 1999. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc. New York: 1.6.1-1.6.2

**Bachman, G. und H. Kinzel.** 1992. Physiological and ecological aspects of the interactions between plant roots and rhizosphere soil. *Soil Biol. Biochem.* 24: 5543-5552

**Backhaus, H., G. Wieland, A. Waberski und S. Meier-Bethke.** 1999. Erfassung der Zusammensetzung von Mikrobenpopulationen und ihrer natürlichen und induzierten Veränderung durch sequenzspezifische Trennung ribosomaler Zielsequenzen. *BioMonitor, Molekulare Mikrobiologie BMBF*, Neuherberg

**Bakken, L.R.** 1997. Culturable and nonculturable bacteria in soil. *In:* J. D. van Elsas, J.M. Trevors, E.M.H. Wellington (eds.). Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker, New York. 47-62

**Bakken, L.R. und V. Lindahl.** 1995. Recovery of bacterial cells from soil. *In:* J.M. Trevors, J.D. von Elsas (eds.). Nucleic acids in the environment. Springer-Verlag, 9-27

**Bej, A.K., M. Perlin und R.M. Atlas.** 1991. Effect of introducing genetically engineered microorganisms on soil microbial community diversity. *FEMS Microb. Ecol.* 86: 169-176

**Beringer, J.E. und M.J. Bale.** 1988. The survival and persistence of genetically-engineered microorganisms. *In:* M. Sussman, C.H. Collins, F.A. Skinner, D.E. Stewart-Tull (eds.). The release of genetically-engineered microorganisms. Academic Press. 29-46

**Bever, J.D.** 1994. Feedback between plants and their soil community in an old field community. *Ecology* 75: 1965-1977

**Bever, J.D., K.M. Westover und J. Antonovics.** 1997. Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *J. Ecol.* 85: 561-573

- Binder, B.J. und Y.C. Liu.** 1998. Growth rate regulation of rRNA content of a marine *Synechococcus* (Cyanobacterium) strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3346-3351
- Boeuf-Tremblay, V., S. Plantureux und A. Guckert.** 1995. Influence of mechanical impedance on root exudation of maize seedlings at two development stages. *Plant Soil* 172: 279-287
- Bolton, H. Jr. J.K. Fredrickson, J.M. Thomas, S.W. Li, D.J. Workman, S.A. Bentjen und J.L. Smith.** 1991. Field calibration of soil-core microcosms: Ecosystem structural and functional comparisons. *Microb. Ecol.* 21: 175-189
- Borneman, J. und E.W. Triplett.** 1997. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbiol population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2647-2653
- Borneman, J., P.W. Skroch, K.M. O'Sullivan, J.A. Palus, N.G. Rumjanek, J.L. Jansen, J. Nienhuis und E.W. Triplett.** 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1935-1943
- Bosworth, A.H., M.K. Williams, K.A. Albrecht, R. Kwiatkowski, J. Beynon, T.R. Hankinson, C.W. Ronson, F. Cannon, T.J. Wacek und E.W. Triplett.** 1994. Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with an extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3815-3832
- Bowen, G.D. und A.D. Rovira.** 1991. The rhizosphere, the hidden half. *In:* Y. Waisel, A. Eshel, U. Kafkafi (eds.). *Plant roots-the hidden half*. Marcel Dekker, New York. 641-649
- Bramwell, P.A., R.V. Barallon, H.J. Rogers und M.J. Bailey.** 1995. Extraction and PCR amplification of DNA from the rhizoplane. *Molecular Microbial Ecology Manual* 1.4.2: 1-20
- Bremer, H. und P.P. Dennis.** 1987. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. *In:* F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H.E. Umbarger (eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA. 1527-1541
- Brinkhoff, T. und G. Muyzer.** 1997. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3789-3796
- Buchholz-Cleven, B.E.E., B. Rattunde und K.L. Straub.** 1997. Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. *System. Appl. Microbiol.* 20: 301-309
- Campell, R. und M.P. Greaves.** 1990. Anatomy and community structure of the rhizosphere. *In:* J.M. Lynch (ed.). *The rhizosphere*. John Wiley & Sons, Chichester. 11-34
- Cole, S.T. und I. Saint Girons.** 1994. Bacterial genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 14: 139-160

- Crawford, D.L., J.D. Doyle, Z. Wang, C.W. Hendricks, S.A. Bentjen, H. Bolton Jr., J.K. Fredrickson und B.R. Bleakley.** 1993. Effect of a lignin peroxidase-expressing recombinant, *Streptomyces lividans* TK 23.1, on biogeochemical cycling and the numbers and activities of microorganisms in soil. Appl. Environ. Microbiol. 59: 508-518
- Curl, E.A. und B. Truelove.** 1986. The Rhizosphere. Springer-Verlag
- Dale Noel, K. und W.J. Brill.** 1980. Diversity and dynamics of indigenous *Rhizobium japonicum* populations. Appl. Environ. Microbiol. 40: 931-938
- Dammann-Kalinowski, T., S. Niemann, M. Keller, W. Selbitschka, C.C. Tebbe und A. Pühler.** 1996. Characterisation of two bioluminescent *Rhizobium meliloti* strains constructed for field release. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 509-512
- Dandurand, L.M.C. und G.R. Knudsen.** 1997. Sampling microbes from the rhizosphere and phyllosphere. In: C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach, M.V. Walter (eds.). Manual of environmental microbiology. American Society for Microbiology, Washington D.C. 391-399.
- Dashman, T. und G. Stotzky.** 1982. Adsorption and binding of amino acids on homoionic montmorillonite and kaolinite. Soil Biol. Biochem. 14: 447-456
- Dashman, T. und G. Stotzky.** 1984. Adsorption and binding of peptides on homoionic montmorillonite and kaolinite. Soil Biol. Biochem. 16: 51-55
- De Leij, F.A.A., E.J. Sutton, J.M. Whipps und J.M. Lynch.** 1994. Effect of a genetically modified *Pseudomonas aureofaciens* on indigenous microbial populations of wheat. FEMS Microb. Ecol. 13: 249-258
- De Leij, F.A.A., E.J. Sutton, J.M. Whipps, J.S. Fenlon und J.M. Lynch.** 1995. Impact of field release of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on indigenous microbial populations of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3443-3453
- DeLong, E.F., G.S. Wickham und N.R. Pace.** 1989. Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science 243: 1360-1363
- Diversity Database User Guide.** 1996. Version 1.0. pdi, Inc. New York
- Dortch, Q., T.L. Roberts, J.R. Clayton Jr. und S.I. Ahmed.** 1983. RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organisms. Mar. Ecol. Prog. Ser. 13: 61-71
- Doyle, J.D., K.A. Short, G. Stotzky, R.J. King, R.J. Seidler und R.H. Olsen.** 1991. Ecologically significant effects of *Pseudomonas putida* PPO301 (pRO103), genetically engineered to degrade 2,4-dichlorophenoxyacetate, on microbial populations and processes in soil. Can. J. Microbiol. 37: 682-691
- Doyle, J.D., G. Stotzky, G. McClung und C.W. Hendricks.** 1995. Effects of genetically engineered microorganisms on microbial populations and processes in natural habitats. Adv. Appl. Microbiol. 40: 237-287

- Drahos, D.J.** 1991. Field testing of genetically engineered microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 9: 157-171
- Duarte, G.F., A.S. Rosado, L. Seldin, A.C. Keijzer-Wolter, J.D. van Elsas.** 1998. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. *Journal of Microbiological Methods* 32: 21-29
- Duineveld, B.M., A.S. Rosado, J.D. van Elsas und J.A. van Veen.** 1998. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization pattern. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4950-4957
- Dymock, D., A.J. Weightman, C. Scully und W.G. Wade.** 1996. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscess. *J. Clin. Microbiol.* 34: 537-542.
- Eichner, C.A., R.W. Erb, K.N. Timmis und I. Wagner-Döbler.** 1999. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 102-109
- El Fantroussi, S., L. Verschuere, W. Verstraete und E.M. Top.** 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 982-988
- Ellis, R.J., I.P. Thompson und M.J. Bailey.** 1995. Metabolic profiling as a means of characterizing plant-associated microbial communities. *FEMS Microb. Ecol.* 16: 9-18
- Engelen, B.** 1998. Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Differenzierung von Funktionen und Strukturen bakterieller Populationen des Bodens. Dissertation, TU Braunschweig
- Engelen, B., K. Meinken, F. v.Wintzingerode, H. Heuer, H.P. Malkomes und H. Backhaus.** 1998. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2814-2821
- Farrelly, V., F.A. Rainey und E. Stackebrandt.** 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2798-2801
- Fegatella, F., J. Lim, S. Kjelleberg und R. Cavicchioli.** 1998. Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Shingomonas* sp. strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4433-4438
- Felske, A.** 1999. Response of predominant soil bacteria to grassland succession. Dissertation. Wageningen Agricultural University, The Netherlands
- Felske, A., B. Engelen, U. Nübel und H. Backhaus.** 1996. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4162-4167

- Felske, A., H. Rheims, A. Wolterink, E. Stackebrandt und A.D.L. Akkermans.** 1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology* 143: 2983-2989
- Felske, A., A. Wolterink, R. van Lis und A.D.L. Akkermans.** 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 871-879
- Felske, A., A.D.L. Akkermans und W.M. de Vos.** 1998b. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4581-4587
- Felske, A., M. Vancanneyt, K. Kersters und A.D.L. Akkermans.** 1999. Application of temperature-gradient gel electrophoresis in taxonomy of coryneform bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 113-121
- Ferris, M.J. und D.M. Ward.** 1997. Seasonal distribution of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1375-1381
- Ferris, M.J., G. Muyzer und D.M. Ward.** 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1045-1059
- Ferris, M.J., S.C. Nold, N.P. Revsbech und D.M. Ward.** 1997. Population structure and physiological changes within a hot spring microbial mat community following disturbance. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1367-1374
- Flärdh, K., P.S. Cohen und S. Kjelleberg.** 1992. Ribosomes exist in large excess over the apparent demand for protein synthesis during carbon starvation in marine *Vibrio* sp. strain CCUG 15956. *J. Bacteriol.* 21: 6780-6788
- Fokkema, N.J. und B. Schippers.** 1986. Phyllosphere versus rhizosphere as environments for saprophytic colonisation *In*: N.J. Fokkema, J. van den Heuvel (eds.). *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge University Press. 137-159
- Fox, G.E., J.D. Wisotzkey und P. Jurtshuk Jr.** 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 166-170
- Fredrickson, J.K. und C. Hagedorn.** 1992. Overview: Identifying ecological effects from the release of genetically engineered microorganisms and microbial pest control agents. *In*: M.A. Levin, R.J. Seidler, M. Rogul (eds.). *Microbial Ecology: Principles, Methods and Applications*. McGraw-Hill, New York. 559-578
- Fuchs, B.M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwiippl, W. Ludwig und R. Amann.** 1998. Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4973-4982

**Führ, A.** 1996. Untersuchungen zu der Biodiversität natürlicher Bakterienpopulationen im Boden mit der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) von 16S rDNA-Sequenzen. Dissertation Universität Kaiserslautern

**Fuhrman, J.A., K. McCallum und A.A. Davis.** 1992. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1294-1302

**Fulthorpe, R.R., C. Mc Gowan, O.V. Maltseva, W.E. Holben und J.M. Tiedje.** 1995. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid degrading bacteria contain mosaics of catabolic genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3274-3281

**Gebhard, F. und K. Smalla.** 1999. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 261-272

**Gerard, J.R. und G. Stotzky.** 1973. Smectite-protein complexes versus non-complexed proteins as energy and carbon sources for bacteria. *Agron. Abstr.* 91

**Germida J.J., S.D. Siciliano, J. Renato de Freitas und A.M. Seib.** 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microb. Ecol.* 26: 43-50

**Griffiths, B.S., K. Ritz und L.A. Glover.** 1996. Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: application of the community DNA hybridization technique. *Microb. Ecol.* 31: 269-280

**Hahn, D., R. Kester, M.J.C. Starrenburg und A.D.L. Akkermans.** 1990. Extraction of ribosomal RNA from soil for detection of *Frankia* with oligonucleotide probes. *Archives of Microbiology* 154: 329-335

**Hale, M.G., L.D. Moore und G.J. Griffin.** 1978. Root exudates and exudation. *In:* Y.R. Dommergues, S.V. Krupa (eds.). *Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants.* Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 163-203

**Hartmann, A., J.J. Giraud und G. Catroux.** 1998. Genotypic diversity of *Sinorhizobium* (formerly *Rhizobium*) *meliloti* strains isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. *FEMS Microb. Ecol.* 25: 107-116

**Heidenreich, B.** 1999. Analyse und Bewertung der Risikoforschung zur Freisetzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen. Dissertation, Universität Hamburg

**Hengstmann, U. und W. Liesack.** 1995. Excision of main 16S rDNA bands from complex denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) pattern for further analysis - a bias related problem?. *In:* K. Smalla, G. Muyzer (eds.). *EU-workshop on the application of DGGE and TGGE in microbial ecology, abstract.*

**Herrera-Cervera, J.A., F.I. Rodríguez-Alonso, J. Olivares und J. Sanjuán.** 1997. Evaluation of the *recA*-based containment system in *Rhizobium meliloti* GR4. *FEMS Microb. Ecol.* 22: 49-56

- Heuer, H.** 1998. Ansätze zur Untersuchung von Bakteriengemeinschaften in Rhizo- und Phyllosphäre von *Solanum tuberosum* L. und transgener T4-Lysozym produzierender Varianten. Dissertation (kumulativ), TU Braunschweig
- Heuer, H. und K. Smalla.** 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. *In: Modern soil Microbiology.* J.D. van Elsas, E.M.H. Wellington, J.T. Trevors (eds.). Dekker, Inc., New York, 353-373
- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla und E.M.H. Wellington.** 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-3241
- Heuer, H., K. Hartung, G. Wieland, I. Kramer und K. Smalla.** 1999. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Appl. Environm Microbiol.* 65: 1045-1049
- Hirsch, R. und J.D. Spokes.** 1988. *Rhizobium leguminosarum* as a model for investigating gene transfer in soil. *In: W. Klingmüller (ed.). Risk Assessment for deliberate release.* Springer-Verlag, 10-17
- Hirsch, P. und J.D. Spokes.** 1994. Survival and dispersion of genetically modified rhizobia in the field and genetic interactions with native strains. *FEMS Microb. Ecol.* 15: 147-160
- Holben, W.E., J.K. Jansson, B.K. Chelm und J.M. Tiedje.** 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 703-711
- Höper, H., C. Steinberg und C. Alabouvette.** 1995. Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to fusarium wilt of flax. *Soil Biol. Biochem.* 27: 955-967
- Iwasaki, K., H. Uchiyama und O. Yaki.** 1994. Survival and impact of genetically engineered *Pseudomonas putida* harboring mercury resistance gene in soil microcosms. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 156-159
- Jensen, M.A. und N. Straus.** 1993. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods Applic.* 3: 186-194
- Jensen, S., S. Øvreås, F.L. Daae und V. Torsvik.** 1998. Diversity in methane enrichments from agricultural soil revealed by DGGE separation of PCR amplified 16S rDNA fragments. *FEMS Microb. Ecol.* 26: 17-26
- Keller, M., I. Homann, U. Dresing, S. Schneiker, W. Selbitschka und A. Pühler.** 1998. Persistenz, Verbreitung und Genomstabilität biolumineszenter isogener RecA<sup>+</sup>/RecA<sup>-</sup> *Sinorhizobium meliloti*-Stämme und Analyse des DNA-Imports in diese freigesetzten Stämme. *In: J. Schiemann (ed.). Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen. Proceedings zum BMBF-Workshop.* BBA Braunschweig

**Kerkhof, L. und B.B. Ward.** 1993. Comparison of nucleic acid hybridization and fluorometry for measurement of the relationship between RNA/DNA ration and growth rate in a marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1303-1309

**Kloepper, J.W., M.N. Schroth und T.D. Miller.** 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70: 1078-1082

**Knudsen, G.R.** 1997. Soil, Rhizosphere and Phyllosphere. *In:* C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach, M.V. Walter (eds.). *Manual of environmental microbiology.* American Society for Microbiology, Washington D.C. 381-382.

**Kowalchuk, G.A., J.R. Stephen, W. de Boer, J.I. Prosser, T. Martin Embley und J.W. Woldendorp.** 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta-subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1489-1497

**Kozdrój, J.** 1995. Effect of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* introduced into soil contaminated with copper(II) on microbial community diversity in the soil and rhizosphere. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11: 546-548

**Kramer, J.G. und F.L. Singleton.** 1992. Variations in rRNA content of marine *Vibrio* spp. during starvation-survival and recovery. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 201-207

**Kramer, J.G. und F.L. Singleton.** 1993. Measurement of rRNA variations in natural communities of microorganisms on the southeastern U.S. continental shelf. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2430-2436

**Kreader, C.A.** 1996. Relief of amplification in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1102-1106

**Lane, D.J.** 1991. 16S / 23S rRNA sequencing. *In:* E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* John Wiley & Sons, Chichester. 115-174

**Lane, D.J., B. Pace, G.J. Olsen, D.A. Stahl, M.L. Sogin und N.R. Pace.** 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 82: 6955-6959

**Latour, X., T. Corberand, G. Laguerre, F. Allard und P. Lemanceau.** 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2449-2456

**Lee, D.H., Y.G. Zo und S.J. Kim.** 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3112-3120

**Lee, S. und J.A. Fuhrman.** 1990. DNA hybridization to compare species composition of natural bacterioplankton assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 739-746



- Lee, S. und J.A. Fuhrman.** 1991. Spatial and temporal variation of natural bacterioplankton assemblages studied by total genomic DNA cross-hybridization. *Limnol. Ocenogr.* 36: 1277-1287
- Lemanceau, P., T. Corberand, L. Gardan, X. Latour, G. Laguerre, J.M. Boeufgras und C. Alabouvette.** 1995. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1004-1012
- Lerman, L.S., S.G. Fischer, I. Hurley, K. Silverstein und N. Lumelsky.** 1984. Sequence-determined DNA separations. *Ann. rev. Biophys. Bioeng.* 13: 399-423
- Leung, K., L.S. England, M.B. Cassidy, J.T. Trevors und S. Weir.** 1994. Minireview: Microbial diversity in soil: effect of releasing genetically engineered microorganisms. *Molecular Ecology* 3: 413-422
- Li, Q.-B. und C.L. Guy.** 1996. Prolonged final extension time increases cloning efficiency of PCR products. *BioTechniques* 21: 192-196
- Liesack, W. und E. Stackebrandt.** 1992. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* 174: 5072-5078
- Liesack, W., P.H. Janssen, F.A. Rainey, N.L. Ward-Rainey und E. Stackebrandt.** 1997. Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. *In: J. D. van Elsas, J.M. Trevors, E.M.H. Wellington (eds.). Modern Soil Microbiology.* Marcel Dekker, New York. 375-439
- Liljeroth, E., S.L.G. Burgers und J.A. van Veen.** 1991. Changes in bacterial populations along roots of wheat seedlings. *Biol. Fertil. Soils* 10: 276-280
- Lindow, S.E., N.J. Panopoulos und B.L. McFarland.** 1989. Genetic engineering of bacteria from managed and natural habitats. *Science* 244: 1300-1307
- Lüdemann, H.** 1996. Charakterisierung mikrobieller Populationen in Lysimetern zur Behandlung von sauren Sickerwässern durch Repräsentierung ihrer genetischen Diversität in der Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE). Diplomarbeit, Universität Braunschweig
- Ludwig, W. und K.-H. Schleifer.** 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 155-173
- Lynch, J.M.** 1990. The rhizosphere. John Wiley & Sons, Chichester
- Lynch, J.M. und J.M. Whipps.** 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129: 1-10
- Mahaffe, W.F. und J.W. Kloepper.** 1997. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microb. Ecol.* 34: 210-223

- Mahaffe, W.F. und J.W. Klopfer.** 1997b. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth-promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. *Can. J. Microbiol.* 43: 344-353
- Maidak, B.L., G.J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M.J. McCaughey und C.R. Woese.** 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 25: 109-110
- Marchesi, J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom und W.G. Wade.** 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 795-799
- Marilley, L., G. Vogt, M. Blanc und M. Aragno.** 1998. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant Soil* 198: 219-224
- Meharg, A.A. und K. Killham.** 1995. Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of microorganisms. *Plant Soil* 170: 345-349
- Mendes, I.C. und P.J. Bottomley.** 1998. Distribution of a population of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii among different size classes of soil aggregates. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 970-975
- Miethling, R., G. Wieland, H. Backhaus und C.C. Tebbe.** 2000. Variation of microbial communities in response to crop species, soil origin and inoculation with the marker gene tagged *Sinorhizobium meliloti* L33. In Druck bei Microbiology Ecology
- Moran, M.A., V.L. Torsvik, T. Torsvik und R.E. Hodson.** 1993. Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 915-918
- Moré, M.I., J.B. Herrick, M.C. Silva, W.C. Ghiorse und E.L. Madsen.** 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1572-1580
- Mozafar, A., F. Duss und J.J. Oertli.** 1992. Effect of *Pseudomonas fluorescens* on the root exudates of two tomato mutants differently sensitive to Fe chlorosis. *Plant Soil* 144: 167-176
- Murray, A.E., J.T. Hollibaugh und C. Orrego.** 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2676-2680
- Muyzer, G. und K. Smalla.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141
- Muyzer, G., E.C. de Waal und A.G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700

- Muyzer, G., A. Teske, C.O. Wirsén und H.W. Jannasch.** 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164: 165-171
- Muyzer, G., S. Hottenträger, A. Teske und C. Wawer.** 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA- A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.4: 1-23
- Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer und C. Wawer.** 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.4: 1-27
- Myers, R.M., S.G. Fischer, L.S. Lerman und T. Maniatis.** 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 13: 3131-3145
- Myers, R.M., V.C. Sheffield und D.R. Cox.** 1989. Mutation detection by PCR, GC-clamps, and denaturing gradient gel electrophoresis. *In: H.A. Ehrlich (ed.). PCR-Technology-Principles and Applications for DNA amplification.* Stockton Press, New York: 71-88
- Myers, T.W und D.H. Gelfand.** 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 31:7661-7665
- Natsch, A., C. Keel, N. Hebecker, E. Laasik und G. Defago.** 1997. Influence of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and its antibiotic overproducing derivative on the diversity of resident root colonizing pseudomonads. *FEMS Microb. Ecol.* 23: 341-352
- Neal, J.R. Jr., T.G. Atkinson und R.I. Larson.** 1970. Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome. *Can. J. Microbiol.* 16: 153-158
- Neal, J.R. Jr., R.I. Larson und T.G. Atkinson.** 1973. Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. *Plant Soil* 39: 209-212
- Nehl, D.B., S.J. Allen und J.F. Brown.** 1996. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Appl. Soil Ecol.* 5: 1-20
- Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham und M. Schaechter.** 1990. Physiology of the bacterial cell. A molecular approach. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts
- Nübel, U., B. Engelen, A. Felske, L. Snaidr, R.I. Amann, W. Ludwig und H. Backhaus.** 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNA in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 178: 5636-5643
- Nübel, U., F. Garcia-Pichel und G. Muyzer.** 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3327-3332

- Nüsslein, K. und J.M. Tiedje.** 1998. Characterization of the dominant and rare members of a young hawaiian soil bacterial community with small-subunit ribosomal DNA amplified from DNA fractionated on the basis of its guanine and cytosine composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1283-1289
- Olivares, J., M.J. Soto, J. Sanjuan und N. Toro.** 1993. Genetics of *Rhizobium* competitiveness. In: R. Guerrero, C. Pedros-Alio (eds.). *Trends in Microbial Ecology*. Spanisch Society for Microbiology: Interactions among populations
- Olsen, G.J., D.J. Lane, S.J. Giovannoni und N.R. Pace.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 337-365
- Orvos, D.R., G.H. Lacy und J. Cairns Jr.** 1990. Genetically engineered *Erwinia carotovora*: survival, intraspecific competition, and effects upon selected bacterial genera. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1689-1694
- Øvreås, L. und V. Torsvik.** 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* 36: 303-315
- Øvreås, L., L. Forney, F.L. Daae und V. Torsvik.** 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3367-3373
- Øvreås, L., S. Jensen, F.L. Daae und V. Torsvik.** 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2739-2742
- Pace, N.R.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740
- Pace, N.R., D.A. Stahl, D.J. Lane und G.J. Olsen.** 1986. The analysis of natural microbial communities by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* 9: 1-55
- Pitcher, D.G., N.A. Saunders und R.J. Owen.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology.* 8: 151-156
- Poulsen, L.K., G. Ballard und D.A. Stahl.** 1993. Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1354-1360
- Rainey, F.A., N.L. Ward-Rainey, P.H. Janssen, H. Hippe und E. Stackebrandt.** 1996. *Clostridium paradoxum* DSM 7308<sup>T</sup> contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology* 142: 2087-2095
- Raskin, L., D. Zheng, M.E. Griffin, P.G. Stroot und P. Misra.** 1995. Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. *Antonie van Leeuwenhoek.* 68: 297-308
- Reysenbach, A.L., L.J. Giver, G.S. Wickham und N.R. Pace.** 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microb.* 58: 3417-3418

- Rheims, H., C. Spröer, F. A. Rainey und E. Stackebrandt.** 1996. Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographic locations. *Microbiology* 142: 2863-2870
- Robleto, E.A., J. Borneman und E.W. Triplett.** 1998. Effects of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture-independent perspective. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 5020-5022
- Rochelle, P.A., B.A. Cragg, J.C. Fry, R.J. Parkers und A.J. Weightman.** 1994. Effect on sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15: 215-225
- Ronson, C.W., A. Bosworth, M. Genova, S. Gudbrandsen, T. Hankinson, R. Kwiatkowski, H. Ratcliffe, C. Robie, P. Sweeney, W. Szeto, M. Williams und R. Zoblottowicz.** 1990. Field release of genetically-engineered *Rhizobium meliloti* und *Bradyrhizobium japonicum* strains. In: P. Gresshoff, S.G. Roth, W. Newton (eds.). Nitrogen fixation: achievements and objectives. Chapman & Hall, New York. 397-403
- Rooney-Varga, J.N., R. Devereux, R.S. Evans und M.E. Hines.** 1997. Seasonal changes in the relative abundance of uncultivated sulfate-reducing bacteria in a salt marsh sediment and in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3895-3901
- Rosado, A.S., G. F. Duarte, L. Seldin und J.D. van Elsas.** 1998. Genetic diversity of *nif H* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analysed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2770-2779
- Rosenbaum, V. und D. Riesner.** 1987. Temperature gradient gel electrophoresis; thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophysical Chemistry* 26:235-246
- Rosset, R. J. Julien und R. Monier.** 1966. Ribonucleic acid composition of bacteria as a function of growth rate. *J. Mol. Biol.* 18: 308-320
- Rovira, A.D. und E.H. Ridge.** 1973. Exudation of  $^{14}\text{C}$ -labelled compounds from wheat roots: influence of nutrients, microorganisms and added organic compounds. *New Phytol.* 72: 1081-1087
- Rychlik, W. und R.E. Rhoads.** 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 17: 8543-8551
- Sackin, M.J. und D. Jones.** 1993. Computer-assisted classification. In: M. Goodfellow, A.G. O'Donnel (eds). Handbook of new bacterial systematics. Academic Press Ltd. 281-313
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich und N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Sambrook, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 6.4.6-6.4.8

- Sanger, F., S. Nicklen und A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467
- Sanguinetti, C.J., E.D. Neto und J.G. Simpson.** 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 17: 914-921
- Santegoeds, C.M., S.C. Nold und D.M. Ward.** 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3922-3928
- Santegoeds, C.M., T.G. Ferdelman, G. Muyzer und D. de Beer.** 1998. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3731-3739
- Sasaki, T., T. Nishiyama, M. Shintani und T. Kenri.** 1997. Evaluation of a new method for identification of bacteria based on sequence homology of 16S rRNA genes. *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 51: 242-247
- Sato, K. und H.-Y. Jiang.** 1996. Gram-positive bacterial flora on the root surface of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil conditions. *Biol. Fertil. Soils* 23: 121-125
- Schwieger, F. und C. Tebbe.** 1998. A new approach to utilize PCR-single-strang conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4870-4876
- Schwieger, F., B. Wilke, J.C. Munch und C.C. Tebbe.** 1997. Ecological pre-release risk assessment of two genetically engineered, bioluminescent *Rhizobium meliloti* strains in soil column model systems. *Biol. Fertil. Soil* 25: 340-348
- Selbitschka, W., A. Pühler und R. Simon.** 1992. The construction of *recA*-deficient *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* strains marked with *gusA* or *luc* cassettes for use in risk-assessment studies. *Mol. Ecol.* 1: 9-19
- Selbitschka, W., U. Dresing, M. Hagen, S. Niemann und A. Pühler.** 1995. A biological containment system for *Rhizobium meliloti* based on the use of recombination-deficient (*recA*-) strains. *FEMS Microb. Ecol.* 16: 223-232
- Selenska-Pobell, S.** 1995. Direct and simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. *Molecular Microbial Ecology Manual* 1.5.1:1-17
- Sheffield, V.C., D.R. Cox, L.S. Lerman und R.M. Myers.** 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 232-236
- Smalla, K., N. Cresswell, L.C. Mendonca-Hagler, A. Wolters und J.D. van Elsas.** 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 78-85
- Srivastava, A.K. und D. Schlessinger.** 1990. Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 105-129.

- Stacey, G.** 1985. The *Rhizobium* experience. In: Engineered Organisms in the Environment: Scientific issues. Proceedings of a cross-disciplinary symposium. Philadelphia, Pennsylvania. American Society for Microbiology, Washington DC. 110-121
- Stackebrandt, E. und B.M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 846-849
- Stahl, D.A., B. Flesher, H.R. Mansfield und L. Montgomery.** 1988. Use of phylogenetically based hybridisation probes for studies of ruminal microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1079-1084
- Steger, G.** 1994. Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. 14: 2760-2768
- Stephen, J.R., G.A. Kowalchuk, M.A. v. Bruns, A.E. McCaig, C.J. Phillips, T.M. Embley und J.I. Prosser.** 1998. Analysis of beta-subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2958-2965
- Strunk, O., W. Ludwig, O. Gross, B. Reichel, N. Stuckmann, M. May, B. Nonhoff, M. Lenke, T. Ginhart, A. Vilbig und R. Westram.** 1997. ARB-a software environment for sequence data. Department of Microbiology, Technical University of Munich, Germany. <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de>.
- Suzuki, M.T und S.J. Giovannoni.** 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62: 625-630
- Tate, R.L.** 1995. Soil Microbiology. John Wiley & Sons, Inc.
- Teske, A., P. Sigalevich, Y. Cohen und G. Muyzer.** 1996. Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure culture. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4210-4215
- Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer und N.B. Ramsing.** 1996b. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1405-1415
- Teske, A., N.B. Ramsing, K. Habicht, M. Fukui, J. Küver, B. Barker Jorgensen und Y. Cohen.** 1998. Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt). Appl. Environ. Microbiol. 64: 2943-2951
- Tiedje, J.M., R.K. Colwell, Y.L. Grossman, R.E. Hodson, R.E. Lenski, R.N. Mack und P.J. Regal.** 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. Ecology 70: 298-315

- Torsvik, V., J. Goksoyr und F.L. Daae.** 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microb. 56: 782-787
- Tsai, Y.L. und B.H. Olson.** 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1070-1074
- Turco, R.F. und D.F. Bezdicek.** 1987. Diversity within two serogroups of *Rhizobium leguminosarum* native to soils in the Palouse of eastern Washington. Ann. Appl. Biol. 111: 103-114
- Vahjen, W., J.C. Munch und C.C. Tebbe.** 1995. Carbon source utilization of soil extracted microorganisms as a tool to detect the effects of soil supplemented with genetically engineered and non-engineered *Corynebacterium glutamicum* and a recombinant peptide at the community level. FEMS Microb. Ecol. 18: 317-328
- Vallaey, T., E. Topp, G. Muyzer, V. Macheret, G. Laguerre, A. Rigaud und G. Soulas.** 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. FEMS Microb. Ecol. 24: 279-285
- Van Elsas, J.D., V. Mantynen und A.C. Wolters.** 1997. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. Biol. Fertil. Soils 24: 188-195
- Van Elsas, J.D., G.F. Duarte, A.S. Rosado und K. Smalla.** 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effect in the soil environment. Journal of Microbiological Methods. 32: 133-154
- Vancura, V.** 1988. Plant metabolites in soil. In: V. Vancura, F. Kunc (eds.). Soil Microbial Associations. Elsevier, Amsterdam. 57-144
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. deVos, K. Kersters und J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiological reviews 60: 407-438
- Villades, P.J., P. Burgos, D. Jording, W. Selbitschka, A. Pühler und N. Toro.** 1996. Comparative analysis of the genetic structure of a *Rhizobium meliloti* field population before and after environmental release of the highly competitive *R. meliloti* strain GR4. FEMS Microb. Ecol. 21: 37-45
- Vincent, J.M.** 1980. Factors controlling the legume-*Rhizobium* symbiosis. In: W.E. Newton, W.H. Orme-Johnson (eds.). Nitrogen fixation (II). University Park Press, Baltimore. 103-129
- Von Wintzingerode, F., U.B Göbel und E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews 21: 213-229
- Wagner, R.** 1994. The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. Arch. Microbiol. 161: 100-106



- Wagner, R., G. Rath, R. Amann, H.P. Koops und K.H. Schleifer.** 1995. *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 18: 251-264
- Wang, Y., Z. Zhang und N. Ramanan.** 1997. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. *J. Bacteriol.* 179: 3270-3276
- Ward, D.M., R. Weller und M.M. Bateson.** 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultivated microorganisms in a natural environment. *Nature* 345: 63-65
- Ward, D.M., M.M. Bateson, R. Weller und A.L. Ruff-Roberts.** 1992. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *In: Marshal, K.C.(ed.). Advances in Microbial Ecology.* Plenum Press, New York. 12: 219-286
- Ward-Rainey, N., F.A. Rainey, H. Schlesner und E. Stackebrandt.** 1995. Assignment of hitherto unidentified 16S rDNA species to a main line of descent within the domain *Bacteria*. *Microbiology* 141: 3247-3250
- Wawer, C. und G. Muyzer.** 1995. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analysed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] Hydrogenase gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2203-2210
- Weller, R., J. Walsh Weller und D.M. Ward.** 1991. 16S rRNA sequences of uncultivated hot spring cyanobacterial mat inhabitants retrieved as randomly primed cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1146-1151
- Westover, K.M., A.C. Kennedy und S.E. Kelley.** 1997. Pattern of rhizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. *J. Ecol.* 85: 863-873
- Whipps J.M.** 1990. Carbon economy. *In: J.M. Lynch (ed). The Rhizosphere.* John Wiley & Sons, Chichester, England. 59-97
- Whipps, J.M. und J.M. Lynch.** 1986. The influence of the rhizosphere in crop productivity. *Adv. Microb. Ecol.* 9: 187-244
- Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271
- Woese, C.R. und G.E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 5088-5090
- Wu, Y., V.M. Hayes, J. Osinga, I.M. Mulder, M.W.G. Looman, C.H.C. Buys und R.M.W. Hofstra.** 1998. Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 26: 5432-5440
- Yanagi, M. und K. Yamasato.** 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA genes using PCR and DNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 107: 115-120
- Zoetendahl, E.G., A.D.L. Akkermans und W.M. de Vos.** 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3854-3859

## 7. Anhang

### Partialsequenzen der eluierten TGGE-Banden

a1:

CAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAG<sub>n</sub>GATGGATTGGTGCCTTCGGGA<sub>ACT</sub>CTGACACAGG  
TGCTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGATTAACACGTAATGGTGGGCACTC  
TAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTT  
ACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGA  
GCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCG

a3:

CAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGA<sub>ACT</sub>CTGACACAGG  
TGCTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGNNTTAATCCCCACTGCCGGTGACAA  
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTG  
CTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATC  
GTAGTCCGGATCACAGTCTGCAACTCGACTGCG

a4:

CCAGGCCUUGACAUGCAGAGAACUUUCCAGAGAUUGGAUUGGUGCCUUCGGGAACUCUGACAC  
AGGUGCUGCAUUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAUGUUGGGUUAAGUCCCGUAACGAG  
CGCAACCCUUGUCCUUAAGUUAACCAGCACGUAAUGGUGGGCACUCUAAGGAGACUGCCGGUGA  
CAAACCGGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAAGUCAUCAUGGCCC<sub>U</sub>UACGGCCUGGGCUACACA  
CGUGCUACAAUGGUCGGUACAGAGGGUUGCCAAGCCGCGAGGUGGAGCUAAUCUCACAAAA  
CCGAUCGUAGUCCGGAUCGCAGUCUGCAACUCGACUGCG

2a4:

UACCCUUGACAUGGAUGGAU<sub>U</sub>CCCCGGAGAGAUUUGGGAGUGCCCCGAAAGGGAACCAUCACA  
CAGGUGCUGCAUUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAUGUUGGGUUAAGUCCCGCAACGA  
GCGCAACCCUUGUCAUUAGUUGCUACGAAAGGGCACUCUAUGAGACUGCCGGUGACAAACC  
GGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAAGUCCUCAUGGCCC<sub>U</sub>UUGGGUAGGGCUUCACACGUCA  
UACAAUGGUACAUAACAGAGCGCCGCCA<sub>U</sub>ACCCGUGAGGGGGAGCUAAUCGCAGAAAGUGUAU  
CGUAGUCCGGAUUGUAGUCUGCAACUCGACUGCA

2a7:

ACUGCCGGUGUAACCGGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAAGUCCUCAUGGCCC<sub>U</sub>UACGGGGU  
GGGCUACACACGUGCUACAAUGGCGACUACAGAGGGUUGCCAAGCCGCGAGGUGGAGCUAA  
UCUCACAAAACCGAUCGUAGUCCGGAUCGCAGUCUGCAACUCGACUGCGUGAAGUCGGAAUC  
GCUAGUAAUCGCGAAUCAGAAUGUCGCGGUGAAUACGUUCCCGGGCCUUGUACACACCGCCC  
GUCACACCAUGGGAGUGGGUUGCACCAGAAGUAGCUAGUCUAACCUUCGGGGGGACGGUUA  
CCACGGUGUGAUUCAUGACUGGGG

2a13:

CAGGCCUUGACAUGCAGAGAACUUUCCAGAGAUUGGAUUGGUACCUUCGGGAACUCUGACAC  
AGGUGCUGCAUUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAUGUUGGGUUAAGUCCCGUAACGAG  
CACAACCCUUGUCCUUAAGUUAACCAGCACGUAAUGGUGGGCACUCUAAGGAGACUGCCGGUGA  
CAAACCGGAGGAAGGUGAGGAUGACGUCAAGUCAUCAUGG<sub>g</sub>CCUUAACGGCCUGGGCUACACA  
CGUGCUACAAUGGUCGGUACAGAGGGUUGCCAAGCCGCGAGGUGGAGCUAAUCUCACAAAA  
CCGAUCGUAGUCCGGAUCGCAGUCUGCAACUCGACUGCG

2a14:

ACAGGUGCUGCAUUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAUGUUGGGUUAAGUCCCGCAACG  
AGCGCAACCCUCGUCCUUAAGUUGCCAUCAUUCAGUUGGGCACUCUAAGGAAACCGCCGGUGA  
UAAGCCGGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAAGUCCUCAUGGCCC<sub>U</sub>UACACGCUGGGCUACACA  
CGUGCUACAAUGGCGGUGACAGUGAGCAGCUAACUCGCGAGAGUAUGCUAAUCUCCAAAAG  
CCGUCUCAGUUCGGAUUGUUCUCUGCAA

2a15:

CUACCCUUGACAUGUCUGGAAUCCUGAAGAGAUUUGGGAGUGCUCGAAAGAGAGCCAGAAC  
ACAGGUGCUGCAUGGCCGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAUGUUGGGUUAAGUCCCGCAACG  
AGCGCAACCCUUGUCAUUAAGUUGCUACGAAAGGGCACUCUAAUGAGACUGCCGGUGACAAAC  
CGGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAGGUCAUCAUGGCCCUUAUGGGUAGGGCUACACACGUC  
AUACAAUGGCCGGGACAGAGGGGUCGCAACCCGCGAGGGGGAGCUAAUCCCAGAAACCCGGU  
CGUAGUCCGGAUCGUAGUCUGCAACUCGACUGCG

2b8:

CAGGUGCUGCAUGGCCGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAUGUUGGGUUAAGUCCCGCAACGA  
GCGCAACCCUGCCAUAUAGUUGCCAUCAUUAAGUUGGGCACUCUAGUGGGACUGCCGGUGAUA  
AGCCGGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAAGUCAUCAUGGCCCUUACGGGCUAGGGCUACACAC  
GUGCUACAAUGGCGGUGACAAUGGGCAGCCACUCCGCGAGGGGAGCUAAUCCCAAAAAGCCG  
UCUCAGUUCGGAUUGUUCUCUGCAACUCGA

2b12:

CCACCUUUGACAUGUACGGAAGUUACCAGAGAUGGUUUCGUGCUCGAAAGAGAACCGUAAC  
ACAGGUGCUGCAUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAUGUUGGGUUAAGUCCCGCAACG  
AGCGCAACCCUUGUCAUUAAGUUGCUACGAAAGGGCACUCUAAUGAGACUGCCGGUGACAAAC  
CGGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAAGUCCUCAUGGCCCUUAUAGGUGGGGCUACACACGUC  
AUACAAUGGCUUGUACAGAGGGUUGCCAACCCGCGAGGGGGAGCUAAUCCCAUAAAACCG  
UCGUAGUCCGGAUCGCAGUCUGCAACUCGACUGCGG

5a1:

UGCUCGAAAGAGAACCAUCACACAGGUGCUGCAUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAU  
GUUGGGUUAAGUCCCGCAACGAGCGCAACCCUUGUCAUUAAGUUGCUACGAAAGGGCACUCUA  
AUGAGACUGCCGGUGACAAACCGGAGAAGGUGGGGAUGACGUCAAGUCCUCAUGGCCCUUA  
UGGGUAGGGCUUCACACGUCAUACAAUGGUACAUAACAGAGCGCCGCCAACCCGCGAGGGGAG  
CUAAUCGCAAAAGUGUAUCGUAGUCCGGAUUGUAGUCUGCAACUCGACUGCA

AF1:

CAGCCCTTGACATGCCCCGGCTAGCTACAGAGATGTAGTGTTCCTTCGGGGACCGGGACACAGG  
TGCTGCATGGCTGTCGTACG<sub>Cucg</sub>TGTCGTGAGAtGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  
CTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAA<sub>ncc</sub>GAGAGG  
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG  
TGGTAGCAGTGGGCGAGACAGCAGTGTCTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGA  
TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCTGCG  
GTGAATACGTTCCCGG<sub>Ga</sub>CCTTGTACACACCGCCCCGT<sub>c</sub>ACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAG  
TAGTGTGCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

AF2:

CAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGTTACCGAGAGATCGTATCCTT<sub>c</sub>AGTTCGGCTGG<sub>Ga</sub>T<sub>c</sub>GGAG<sub>AC</sub>  
AGGTGCTGCATGACTGT<sub>c</sub>GTCAGCTCGTRTCGTGAGAtGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA  
ACCTCGCCCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAA<sub>accg</sub>AG  
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTA<sub>c</sub>A<sub>c</sub>ACGTGCTACAA  
TGGTGGTGACAGT<sub>g</sub>GGCAGCGAGACCGCGAGGTGASSTAAT<sub>c</sub>TCCAAAAGCCATCTCAGTTCG  
GATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGAATGCCA  
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGT<sub>c</sub>ACACCATGGGAGTTGGTTTT<sub>a</sub>CCCGA  
aGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCAGGC

AF3:

CAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGTTACCGGAGACGGTATCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGTGA  
CAGGtGCTGCATGGCTGTCGTACG<sub>Cucg</sub>TGTCGTGAGAWGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAA<sub>acc</sub>GA  
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTAC  
AATGGTGGTGACAGTGGGCGAGCGAGACCGCGAGG<sub>Gtga</sub>SSTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTC  
GGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCT  
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGT<sub>c</sub>ACACCATGGGAGTTGGTTTT<sub>a</sub>CCCGA  
GAAGTAGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

## AF4a:

GGCTGGATCGG<sub>n</sub>GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC<sub>tc</sub>GTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGT  
CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTG  
CCGGTGATAAG<sub>cc</sub>GAGAGGAAGGTGGGGAT<sub>n</sub>ACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGC  
TACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACCGCGAGGT<sub>c</sub>GAGCTAATCTCCAA  
AAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATC  
GCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGG  
GAGTTGGTTCTACCCGAAG<sub>g</sub>TAGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

## AF4b:

CAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGATACGAGAGATCGTATCCTTCAGTTCGGCTGGATCGGAGA  
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC<sub>ucg</sub>TGTCGTGAGAU<sub>g</sub>GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAG<sub>cc</sub>GA  
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTAC  
AATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACH<sub>g</sub>GCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTT  
CGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCG<sub>Ch</sub>GAT<sub>c</sub>AGCATG<sub>Ch</sub>  
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGT<sub>t</sub>GGT<sub>Th</sub>TACCCG  
AAG<sub>g</sub>TAGTG<sub>n</sub>GCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

## AF5:

CAGCCCTTGACATGCCCCGGCTACTTGCAGAGATGCAAGGTTCCCTTCGGGGACCGGGACACAGG  
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGC<sub>ucg</sub>TGTCGTGAGAT<sub>t</sub>GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  
CTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAR<sub>cc</sub>GAGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCCACAAT  
GGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACCGCGAGG<sub>tcg</sub>ASSTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTTCGGA  
TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGT<sub>a</sub>ATCGCAGATCAGCATGCTGCG  
GTGAATACGTTCCCGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGT  
AGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

## AF6:

CAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGATACGAGAGATCGTATCCTTCAGTTCGGCTGGATCGGAGA  
CAGG<sub>t</sub>GTGCATGGCTGTCGTCAGC<sub>ucg</sub>TGTCGTGAGAT<sub>t</sub>GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA  
ACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAR<sub>ccg</sub>AG  
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTT  
CGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGT<sub>a</sub>ATCGCGGAT<sub>c</sub>AGCATGCC  
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCC  
GAAGTAGTGTGCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

## AF7:

CAGCCCTTGAC<sub>t</sub>ATCCCGAT<sub>c</sub>GCGGATACGAGAD<sub>tc</sub>GTATCCTT<sub>c</sub>AGTTCGGCTKG<sub>a</sub>T<sub>c</sub>GGAGAcAG  
G<sub>t</sub>gCTGCATGGCTRTCGT<sub>c</sub>AG<sub>a</sub>T<sub>cg</sub>TGTCGTGARAWGTTGGGTAAAGT<sub>c</sub>CCGCAACGAGCGCAAcC  
CTCGCCCTTAGTTGCCAGCATT<sub>t</sub>AGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGC<sub>c</sub>GGTGATAA<sub>accg</sub>AgAGGA  
AGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTAcAcAcGTGCTAcAATGGTG  
GTGAcAGT<sub>g</sub>GGCAGCGAgAcCGCAAGG<sub>tcgacg</sub>TAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCAC  
TCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGAT<sub>c</sub>AGCATGCCGCGGTGAAT  
ACGTTCCCGGGCCTTGTAAC<sub>AcAcc</sub>GCCCGTMA<sub>c</sub>ACCATGGGAGT<sub>t</sub>GGTTCTACCCGAAGTAGTGCG  
CtAACCGCAAGAGGCAGCT

## AF8:

CAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGATACGAGAGATCGTATCCTCAGTTCGGCTGGATCGGAGAC  
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC<sub>ucg</sub>TGTCGTGAGAWGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA  
ACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAR<sub>accg</sub>AG  
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGAcAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTC  
GGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTGGTAATCGCGGATCAGCATGCC  
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCC  
GAAGTAGTGTGCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

## AF9:

CAGCCCTTGACATGCCCCGGCTACTTGCAGAGATGCAAGGtTCCCTTCGGGGACCGGGACACAGG  
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGC<sub>Cucg</sub>TGTCGTGAGAtGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  
CTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTgCCGGTGATAAR<sub>cc</sub>GAGAGG  
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG  
TGGTGACAGTGGGCAGCGAGCaCGCgAGTgTGAGCtAATCiCCAAaagCCATCTCAGTTCGGATTGC  
aCTCTGCaACTCGAGTGCATGAaGTTGGAATCGCTAGTMATCgCGGATcAgCATGCCGCGGTGAAT  
ACgTCCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTcACACCATGGGAGTYGGTTTTACCCGAAGTAGTGC  
GCTAACCGCAAGGaGGCAGC

## AG1:

CAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGATACGAGAGATCGTATCCTTCAGTTCGGCTGGATCGGAGA  
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC<sub>Cucg</sub>TGTCGTGAGAWGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG  
CAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAR<sub>ccg</sub>  
AGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACCGCGAGGtcGASSTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTT  
CGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCACAGATCAGCATGC  
TGCGGTGAATACGTTCCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACC  
CGAAGTAGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

## AG2:

CAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGATACGAGAGATCGTATCCTTCAGTTCGGCTGGaTCGGAGA  
CAGGtGCTGCATGGCTGTCGTCAGC<sub>Ctcg</sub>TGTCGTGAGAtGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA  
ACCTTCGCCCTTAGTTGCCAGCaTTCAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAR<sub>cc</sub>GCG  
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACGCACGTGCTACA  
ATGGTGATGACAGTgGGCAGCGAGACCGCGAGGtcGaSSTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTG  
GATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTaATCGCAGATcAGCATGCTGC  
GGTGAATACGTTCCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTcACACCATGGGAGTTGGTTCTACCCGA  
AGTAGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

## AG3:

CAGCCCTTGACATGCCCCGGCTACTTGCAGAGATGCAAGGTTCCCTTCGGGGACCGGGACACAGG  
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGC<sub>Cucg</sub>TGTCGTGAGAtGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  
CTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAR<sub>cc</sub>GAGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCCACAAT  
GGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACCGCGAGGtcgASSTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTTCGGA  
TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTaATCGCAGATCAGCATGCTGCG  
GTGAATACGTTCCCGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGT  
AGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

## AG4:

CAGCCCTTGAcATCCCGATCGCGGATACGAGAGATCGTATCCTTCAGTTCGGCTGGATCGGAGAc  
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC<sub>Cuc</sub>GTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAA<sub>gcc</sub>GA  
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTAC  
AATGGTGGTGACAGTGGGCAgCGAGACCGCGAGG<sub>uca</sub>GCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTC  
GGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCT  
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTcACACCATGGGAGTTGGTTCTACCC  
GAAGgTAGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

## AG5:

CAGCCCTTGACAT<sub>n</sub>CCGGTCGCGGACAGTGGAGACATTGTCCTTCAGTTAGGCTGGACCGGACA  
CAGGTgCTGCATGGCTGTCGTCAGC<sub>Cuc</sub>GTGTCGTGAGAuGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCgC  
CACCTTCGCC<sub>n</sub>CTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTA<sub>nn</sub>GGGACTGCCGGTGATAA<sub>ncc</sub>GAG  
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGCGGTGACAnTGGGCAGCnAACCCGCGAGG<sub>nn</sub>GAGCTAATCTCCAAAAGCCaTCTCAGTTTCG  
GATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCtAGTAATCGTGATCAgAACGCCAC  
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGA  
AGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCAGGC

## AG6:

CAGCTCTTGACATCCCCGATCGCGGACAGTGGAGACATTGTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGTGA  
CAGGtGCTGTCATGGCTGTCGTCAGCWNRTGTCGTGAGAtGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG  
CAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAannR  
AGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACCGCGAGGtcgASSTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTT  
CGGATTGCACTCTGCAACTCGATTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC  
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACC  
CGAAGTAGTGCGCTAACCGCAAgGAGGCAGCT

## AG7:

CAGCCCTTGACATGCCCCGGCCAGCTACAGAGATGTAGTGTTCCCTTCGGGGACCGGGACACAGG  
TGCTGTCATGGCTGTCGTCAGCucgTGTCGTGAGAtGTTGGGTAAAGTcCCGCAACGAGCGCAACCC  
TCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAARccGAGAGG  
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTAcAATGG  
TGGTGACAGTgGGCAGCGAGCACgCGAGTgTGAGCTAATcTCCAAAAGCCATCTCAGTTTCGGATT  
GCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTaATCGCGGATYAGCATGCCGCGGT  
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTcACACCATGGGAGTTGGTTTTAcCCGAAGTA  
GTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

## AG8:

CAGCCCTTGACATnCGGTTCGCGAGnnCCAGAGATGGaTnTCTTCAGTTTCGGCTGGACCGAGTACA  
GGTGCTGTCATGGCTGTCGTCAGCucgTGTCGTGAGAtGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC  
CCTCGCCCCTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCnAGGGGACTGCCGGTGATAARccgnGAG  
GaAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GCGGTGACAGTGGGAnGCGGAGGGGTGACCCCGAGCAAATCTCAAAAAGCCnTCTCAGTTcGnGA  
TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTaATCGCAGATcAGCATGCTGCG  
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTcACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAA  
GTGCTGCGCCAACCGCAAGGAGGCAG

## E215:

GUGUCGAAAGaGAGCCAGAACACAGGUGCUGCAUUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAU  
GUUGGGUUAAGUCCCGCAACGAGCGCAACCCUnGnUnUUAGUUGCCACCAUUUAGUUGGGCA  
CUCUAAUGAGACUGCCCGGUGACAAACCGGAGGAAGGUGGGAUGACGUCAGGUCAUCAUGG  
CCCUUAUGGGUAGGGCUACACAGUCAUACAAUGGCUGGUACAGAGGGUUGCCAACCCGCGA  
GGgGGAGCUAAUCCCAUAAAACCAGUCGUAGUCCGGAUCGUAGUCUGCAACUCGacUACG

## GJ12:

CAGCCCUUGACAUCCCGAUUCGCGGAUACGAGAGAUUCGUAUCCUUCAGUUCGGCUGGAUCGGA  
GACAGGUGCUGCAUUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAUUUGGGUUAAGUCCCGCAAC  
GAGCGCAACCCUCGCCCUUAGUUGCCAGCAUUCAGUUGGGCACUCUAAGGGGACUGCCGGUG  
AUAAGCCGAGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAAGUCCUCAUGccGUUACGGGCUGGGCUACAC  
ACGUGCUACAAUGGUGGUGACAGUGGGCAGCGAGACCGCGAGGUCGAGCUAAUCUCCAAAA  
GCCAUCUCAGUUCGGAUUGCACUCUGCAACUCGAGUGCA

## R14:

CUAGGUUUGACAUAUACCGGAAAGCUGCAGAGAUAGCAGCCCCCGCAAGGUCGGUAUACAGG  
UGGUGCAUUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAUUUGGGUUAAGUCCCGCAACGAGCGC  
AACCUCGUCCUAUGUUGCCAGCGGGUAAUGCCGGGGACUCAUAGGAGACUGCCGGGGUCA  
CUCGGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAAGUCAUAGUCCCCUUAAGUCUAGGGCUUCACGCA  
UGCUAACAAUGGCUGGUACAAAGGGCUGCAAUACCGCAAGGUGGAGCGAAUCCCAAAAAGCC  
AGUCUCAGUUCGGAUUGGGGUCUGCAACUCGACCCCA

## R21:

GAAACACGGUGUCCUUCGGGGUCCnnGCACAGGUGGUGCAUUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCG  
UGAGAUGUUGGGUUAAGUCCCGCAACGAGCGCAACCCUUGUCCUAUGUUGCCAGCGGGUAA  
UGCCGGGGACUCGUAGGAGACUGCCGGGGUCAACUCGGAGGAAGGUGGGGACGACGUCAAG  
UCAUCAUGCCCCUUAUGnChAGGGCUGCAAACAUGCUACAAUGGCCAGUACAnAGGGCUGCAA  
ACCCGCGAGGnGGAGCGAAUCCCAAAAAGCUGGUCUCAGUUCGGAUCGUAGUCUGCAACUCG  
ACUnCG

R24:

CAACCCUUGACAUGGCAGG<sub>n</sub>CGGUUUCAGAGAUGGAU<sub>nn</sub>CUUCACUUCGGUGACCUGCACAC  
AGGUGCUGCAUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAUGUUGGGUUAAGUCCCGCAACGAG  
CGCAACCCUCG<sub>n</sub>CCCUAGUUGCCAUCAUUUAGUUGGGCACUCUAAGGGGACUGCCGGUGAUA  
AGCCGGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAAGUC<sub>n</sub>UCAUGGCCCUUACGGGUUGGGCUACACACG  
UGCUAACAAGGCGGUGACAGAGGGCUGCUAGUCCGCGAGGACAUGCUAAUCCCUAAAAGCCG  
UCUCAGUUCGGAUUGCACUCUGCAACUCGAGUGCA

R26:

ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC  
GCAACCCTCGTCCTTAGTTGCCATCATTCAAGTGGGCACTCTAAGGAAACCGCCGGTGATAAGC  
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACACGCTGGGCTACACACGTGCT  
ACAATGGCGGTGACAGTGAGCAGCTAACCCGCGAGGGTATGCTAATCTCCAAAAGCCGTCTCA  
GTTTCGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCA

R32:

CTGGGTTTGACATATGCCGGAAGCTCCAGAGATGGAGCCCC<sub>n</sub>TTT<sub>nn</sub>GTCGGTACACAGGTGGT  
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTC  
GTCCTATGTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGG  
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGG  
CCGGTACAAAGGGCTGCGATA<sub>n</sub>CGCAAG<sub>n</sub>TGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGA  
TTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA

R34:

CAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGATACGAGAGATCGTATCCTTCAGTTCGGCTGGATCGGAGA  
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG  
CAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCC  
GAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCT  
ACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACCGCGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCA  
GTTTCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCA